



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Badania dynamiki molekularnej oraz fizycznej i chemicznej stabilności amorficznych form doustnych leków przeciwcukrzycowych będących pochodną sulfonylomocznika

Author: Żaneta Wojanrowska

Citation style: Wojanrowska Żaneta. (2012). Badania dynamiki molekularnej oraz fizycznej i chemicznej stabilności amorficznych form doustnych leków przeciwcukrzycowych będących pochodną sulfonylomocznika. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



**UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH**

**Instytut Fizyki
Zakład Biofizyki i Fizyki Molekularnej**

PRACA DOKTORSKA

**Badania dynamiki molekularnej oraz fizycznej i chemicznej stabilności
amorficznych form doustnych leków przeciwcukrzycowych
będących pochodną sulfonilomocznika**

Żaneta Wojnarowska

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Marian Paluch

KATOWICE 2012

*Serdecznie podziękowania
za życzliwość, poświęcony czas oraz ogromne wsparcie merytoryczne,
składam Panu Profesorowi dr hab. Marianowi Paluchowi.*

*Pragnę również podziękować
Pracownikom i Doktorantom Instytutu Fizyki UŚ
za owocną współpracę.*

Ż.W.

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu pt. *From Study of Molecular Dynamics in Amorphous Medicines at Ambient and Elevated Pressure to Novel Applications in Pharmacy*, realizowanego w ramach programu Team Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej – Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

SPIS TREŚCI

WSTĘP	6
1 PODSTAWY FIZYKI CIECZY TWORZĄCYCH FAZĘ SZKLISTĄ.....	11
1.1 Szkło – informacje wstępne	11
1.2 Metody otrzymywania materiałów amorficznych	12
1.2.1 Sposoby amorfizacji substancji leczniczych	12
1.3 Fenomenologia przejścia ciecz – szkło	15
1.3.1 Termodynamiczny aspekt przejścia szklistego.....	15
1.3.2 Przejście do fazy szklistej a dynamika molekularna	18
2 METODY ANALIZY FIZYKOCHEMICZNEJ AMORFICZNYCH FARMACEUTYKÓW.....	24
2.1 Analiza strukturalna i skład chemiczny farmaceutyków	25
2.1.1 Dyfrakcja rentgenowska (XRD).....	25
2.1.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	27
2.1.3 Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)	29
2.2 Badania kalorymetryczne.....	30
2.3 Badania dynamiki molekularnej amorficznych leków w funkcji temperatury i ciśnienia	32
2.3.1 Podstawy teoretyczne spektroskopii dielektrycznej (BDS).....	32
2.3.2 BDS - technika pomiarowa.....	39
2.4 Pomiary czystości i rozpuszczalności farmaceutyków metodą HPLC	41
3 CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW.....	44
3.1 Mechanizm działania leków opartych na PSM.....	45
3.2 Charakterystyka fizykochemiczna badanych leków	47
4 BADANIA LEKU PRZECIWCUKRZYCOWEGO I GENERACJI – CHLORPROPAMIDU (CHL).....	48
4.1 Badania chemicznej stabilności amorficznej formy CHL	49
4.2 Dynamika molekularna CHL w warunkach ciśnienia atmosferycznego	51

5	BADANIA LEKÓW PRZECIWCUKRZYCOWYCH II GENERACJI – GLIBENKLAMIDU (GCM) I GLIKLAZYDU (GCL)	59
5.1	Chemiczna stabilność amorficznych form GCM – witrifikowanej i kriomielonej...	59
5.1.1	Badania stabilności z wykorzystaniem techniki FT-IR	64
5.2	Dynamika molekularna oraz fizyczna stabilność amorficznej formy GCM w ciśnieniu atmosferycznym.....	71
5.2.1	Molekularna ruchliwość fazy przechłodzonej witrifikowanej próbki GCM ...	71
5.2.2	Identyfikacja molekularnego pochodzenia drugorzędowych procesów relaksacyjnych GCM	78
5.2.3	Dynamika molekularna oraz fizyczna stabilność kriomielonej próbki GCM ..	84
5.3	Kinetyka reakcji tautomerizacji GCM	89
5.3.1	Badania z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej.....	90
5.3.2	Analiza z zastosowaniem techniki PVT	96
5.4	Wpływ wysokiego ciśnienia na dynamikę molekularną GCM.....	98
5.5	Badania amorficznej postaci gliklazu (GCL).....	103
6	BADANIA GLIMEPIRYDU (GMP) - LEKU PRZECIWCUKRZYCOWEGO III GENERACJI.....	109
6.1	Chemiczna stabilność amorficznej postaci GMP.....	109
6.2	Dynamika molekularna fazy szklistej i cieczy przechłodzonej GMP.....	112
6.3	Kinetyka reakcji transferu protonu w skondensowanej próbce GMP.....	117
6.4	Czynniki determinujące stabilność fizyczną amorficznej formy GMP	120
7	ANALIZA PORÓWNAWCZA ROZPUSTCZALNOŚCI AMORFICZNYCH FORM PSM	122
8	PODSUMOWANIE	128
	LITERATURA	131

WSTĘP

Cukrzyca jest przewlekłą chorobą charakteryzującą się niedoborem lub nieprawidłowym działaniem insuliny wytwarzanej przez komórki β wysp Langerhansa trzustki. Ten peptydowy hormon odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów, umożliwiając transport glukozy do wnętrza komórek. Kiedy jego ilość jest niewystarczająca, cukier pozostaje niewykorzystany w krwioobiegu. W takiej sytuacji komórki organizmu „głodują” co w konsekwencji uniemożliwia ich prawidłowe funkcjonowanie. Oznaką choroby jest poziom cukru we krwi przewyższający 125 bądź 200 mg/dl, odpowiednio na czczo i dwie godziny po posiłku¹.

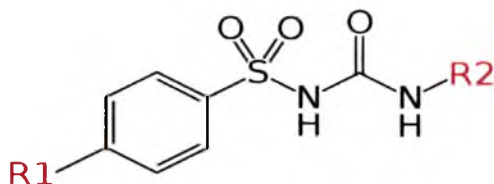
Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) obecnie na świecie żyje aż 250 mln osób chorych na cukrzycę. Dodatkowo, prognozy na 2030 rok są przerażające – liczba chorych może wzrosnąć nawet do 380 milionów. Cukrzyca stanowi istotny problem również w Polsce. Ocenia się, że w naszym kraju schorzenie to dotyka obecnie blisko 2 mln osób. Wielce niepokojący jest również fakt, że Polska jest jednym z dziesięciu krajów całego świata charakteryzujących się największą liczbą osób, u których diagnozuje się tzw. stan przedcukrzycowy, będący początkiem rozwoju właściwego schorzenia². Pojawia się więc pytanie, *jak skutecznie walczyć z tą chorobą?* W przeciwieństwie do cukrzycy typu 1, w której konieczne są iniekcje insulinowe, w przypadku cukrzycy 2 typu (ang. *Non-insulin dependent diabetes mellitus*), stanowiącej 90% wszystkich zachorowań, stosuje się terapię doustnymi farmaceutykami. Z uwagi na niski koszt leczenia najpopularniejsze są leki będące pochodnymi sulfonilomocznika (PSM), których głównym zadaniem jest stymulowanie komórek trzustki do zwiększonej sekrecji insuliny.



Rys. 1 Prof. Zdzisław Brzozowski.

Jednym z pierwszych leków przeciwcukrzycowych z serii PSM był glipolamid, zsyntezowany przez Polaka prof. Zdzisława Brzozowskiego - chemika, pracownika ówczesnej Akademii Medycznej w Gdańsku. Wyniki wieloletnich badań przedklinicznych i klinicznych pokazały, iż glipolamid to oryginalny lek, nie naśladujący żadnego z istniejących i skuteczny w leczeniu cukrzycy³. Dlatego też w 1985 roku Komisja Leków w Warszawie wydała decyzję o jego rejestracji, a Starogardzkie Zakłady Farmaceutyczne „Polfarm” rozpoczęły produkcję.

Z kolei rdzeń sulfonilomocznikowy (Rys. 2), będący „sercem” glipeptamidu, stał się podstawą do opracowania kolejnych leków PSM wprowadzonych na rynek w późniejszych latach.



Rys. 2 Rdzeń sulfonilomocznikowy warunkujący działanie hipoglikemizujące. R1 i R2 oznaczają różne typy podstawników chemicznych.

Niestety, pomimo tego, iż pochodne sulfonilomocznika bardzo łatwo przenikają przez bariery biologiczne ich biodostępność jest limitowana przez słabą rozpuszczalność. Nasuwa się więc pytanie: *Czy można zwiększyć dostępność farmaceutyczną leków przeciwcukrzycowych, a w konsekwencji poprawić skuteczność ich działania?*

Najnowsze doniesienia naukowe pokazują, iż metodą niosącą za sobą znaczną poprawę rozpuszczalności leku jest amorfizacja substancji leczniczej, polegająca na wytworzeniu materiału nieposiadającego dalekozasięgowego uporządkowania charakterystycznego dla kryształu^{4,5}. Zwiększona rozpuszczalność substancji amorficznych wynika z faktu, iż materiały te charakteryzuje większa wartość energii swobodnej Gibbsa w porównaniu z ich odpowiednikami krystalicznymi.⁶ Niestety, również z tego samego powodu, forma amorficzna jest termodynamicznie niestabilna - w trakcie przechowywania bardzo często ulega rekrytalizacji, jednocześnie tracąc korzyści płynące ze stanu amorficznego.⁷ Z tego powodu w chwili obecnej przeważająca większość substancji leczniczych dostępnych na rynku farmaceutycznym posiada postać krystaliczną. Mimo tego, produkcja stałych form leków - tabletek i kapsulek, w których substancja lecznicza występuje w formie amorficznej stanowi jedno z ważniejszych zadań, jakie stawia przed sobą nowoczesny przemysł farmaceutyczny. Dlatego też, celem niniejszej pracy jest wykonanie badań fizykochemicznych, amorficznych leków przeciwcukrzycowych należących do grupy PSM, mających na celu określenie ich fizycznej oraz chemicznej stabilności, opisanie ruchliwości molekularnej cząsteczek oraz porównanie rozpuszczalności z ich odpowiednikami krystalicznymi. Z uwagi na fakt, iż grupa sulfonilomocznikowa, obecna we wszystkich badanych farmaceutykach, może występować w postaci izomerów konstytucyjnych, wszystkie PSM będą również analizowane pod kątem tendencji do tautomerizacji. Powiązanie ze sobą wszystkich otrzymanych wyników umożliwi wyłonienie, z badanej grupy leków, substancji charakteryzującej się największą dostępnością

farmaceutyczną, w porównaniu z komercyjnymi odpowiednikami krystalicznymi, a jednocześnie spełniającą rygorystyczne wymagania przemysłu farmaceutycznego.

Jako materiał badawczy wybrano substancje lecznicze należące zarówno do I, II jak i III generacji leków przeciwcukrzycowych opartych na grupie sulfonilomocznikowej tj. chlorpropamid, glibenklamid, gliklazyd oraz glimepiryd. Z kolei w celu otrzymania amorficznych postaci wymienionych farmaceutyków zastosowano (i) witrifikację - najprostszą z poznanych technik otrzymywania fazy szklistej - polegającą na szybkim przechłodzeniu uprzednio stopionego kryształu, oraz (ii) mielenie mechaniczne w temperaturze ciekłego azotu, uważane dotąd za „najbezpieczniejszą” metodę amorfizacji. Ponieważ znane są przykłady, gdzie topieniu substancji leczniczej towarzyszy jej rozkład termiczny⁸, każda z otrzymanych amorficznych próbek była analizowana pod kątem chemicznej stabilności. Metody fizykochemiczne zastosowane w tym celu to: spektroskopia w podczerwieni (FT-IR), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz technika ultraprawnej chromatografii cieczowej (UPLC). Z kolei w celu zbadania fizycznej stabilności amorficznych PSM zastosowano w pierwszej kolejności szerokopasmową spektroskopię dielektryczną (BDS), która umożliwia rejestrowanie ruchów cząsteczek w bardzo szerokich zakresach częstotliwości oraz w różnych warunkach termodynamicznych. Technika ta jest niezwykle użytecznym narzędziem umożliwiającym określenie tendencji układu do rekrytalizacji ponieważ uważa się, iż molekularna ruchliwość jest niezwykle istotnym czynnikiem determinującym stabilność leków w stanie amorficznym. Dlatego też, w niniejszej pracy wykonana została kompleksowa charakterystyka dynamiki molekularnej faz przechłodzonej i szklistej analizowanych substancji leczniczych w różnych warunkach ciśnienia i temperatury. Dopełnieniem badań jest analiza rozpuszczalności amorficznych leków PSM wykonana w Zakładach Farmaceutycznych „Polpharma SA”.

Niniejsza praca podzielona została na osiem rozdziałów. Pierwszy z nich przedstawia problematykę związaną z przejściem ciecz-szkło tj. metody otrzymywania substancji amorficznych oraz termodynamiczny i dynamiczny aspekt przejścia szklistego. Drugi rozdział zawiera krótki zarys metod fizykochemicznych zastosowanych w celu określenia czystości oraz fizycznej stabilności amorficznych PSM, a także scharakteryzowania ich dynamiki molekularnej. W tym miejscu największy nacisk położony został na opis podstaw teoretycznych szerokopasmowej spektroskopii dielektrycznej oraz zjawisk relaksacyjnych obserwowanych w cieczach przechłodzonych i szklach. W kolejnym, trzecim rozdziale scharakteryzowano badane substancje farmaceutyczne. Z kolei dalsza część pracy

przedstawia własne wyniki pomiarów oraz ich analizę. Rezultaty badań podsumowano w rozdziale ósmym.

Badania zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wykonano w ramach projektu TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „*From Study of Molecular Dynamics in Amorphous Medicines at Ambient and Elevated Pressure to Novel Applications in Pharmacy*”. Rezultaty przeprowadzonych eksperymentów zaprezentowano na konferencjach międzynarodowych i krajowych, a także seminariach międzyuczelnianych:

- ❖ 6th International Conference on Broadband Dielectric Spectroscopy and Its Applications, Madrid, Hiszpania (7-10.09.2010) „*Study of kinetics of tautomerization process in some pharmaceutically important molecules – new application of BDS*”
- ❖ XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Gdańsk (12-15.09.2010) „*Tautomeryzacja leków przeciwcukrzycowych na przykładzie glibenklamidu - detekcja, monitoring, znaczenie aplikacyjne*” (prelegent)
- ❖ Seminarium międzyuczelniane – Technische Universitat Dortmund (23.11.2010) „*Molecular dynamics, physical stability and tautomerization phenomenon of glassy glibenclamide drug studied by broadband dielectric spectroscopy*” (prelegent)
- ❖ X Seminarium Katowicko - Krakowskie „Fizyka Fazy Skondensowanej (21.05.2011) „*Tautomeryzacji amorficznych substancji leczniczych jako kluczowy problem w badaniach preformulacyjnych*” (prelegent)
- ❖ 2nd World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development, 18–22.09.2011, Zadar, Croatia „*Physical insight into tautomerization reaction in some pharmaceutically important molecules*” (prelegent)

Większość wyników przedstawionych w poniższej pracy opublikowano również w czasopiśmie z listy filadelfijskiej:

- ❖ Z. Wojnarowska, K. Grzybowska, K. Adrjanowicz, K. Kaminski, M. Paluch, L. Hawelek, R. Wrzalik, M. Dulski, W. Sawicki, J. Mazgalski, A. Tukalska T. Bieg - *Study of the Amorphous Glibenclamide Drug: Analysis of the Molecular Dynamics of Quenched and Cryomilled Material* - Mol. Pharmaceutics, 7 (5), 1692–1707 (2010)
- ❖ Z. Wojnarowska, P. Włodarczyk, K. Kaminski, K. Grzybowska, L. Hawelek, M. Paluch - *On the Kinetics of Tautomerism in Drugs - New Application of Broadband Dielectric Spectroscopy* – J. Chem. Phys. 133, 8 (2010)

- ❖ Z. Wojnarowska, K. Adrjanowicz, K. Kaminski, L. Hawelek, M. Paluch, *Effect of pressure on tautomers equilibrium in supercooled glibenclamide drug - Analysis of fragility behavior* – J. Phys. Chem. B 25, 114(46), 14815-20 (2010)
- ❖ Z. Wojnarowska, M. Paluch, J. Pionteck - *The tautomerization phenomenon of glibenclamide drug monitored by means of volumetric measurements* – J. Chem. Phys. 135, 214506, (2011)
- ❖ P. Włodarczyk, M. Paluch, Z. Wojnarowska, L. Hawelek, K. Kaminski and J. Pilch - *Theoretical and experimental studies on the internal mobility of two sulfonylurea agents: glibenclamide and glimepiride* - J. Phys. Condense. Matter, 23, 42, 425901 (2011)

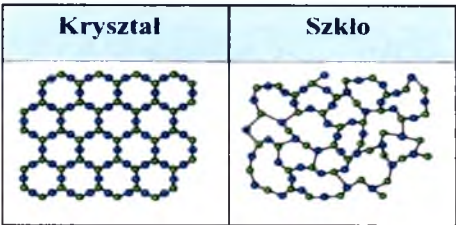
Oraz spoza listy filadelfijskiej:

- ❖ Z. Wojnarowska, P. Włodarczyk, M. Paluch, *Broadband Dielectric Spectroscopy – A New Tool for the Investigation of Tautomerization and Mutarotation Phenomena in Organic Compounds*, Dielectrics Newsletter 25, (2011)

1 PODSTAWY FIZYKI CIECZY TWORZĄCYCH FAZĘ SZKLISTĄ

1.1 Szkło – informacje wstępne

Przeglądając dane literaturowe można znaleźć wiele definicji szkła. Jedna z najbardziej popularnych określa je jako *amorficzne ciało stałe, które nie posiada*



Rys. 1.1 Schematyczna ilustracja struktury materiału krystalicznego i amorficznego.

*uporządkowanej struktury kryształu, ale wykazuje jego własności mechaniczne.*⁹ Przyglądając się strukturze szkła w skali atomowej można zauważyć, iż cząsteczki je tworzące ułożone są w sposób chaotyczny, przypominając bardziej strukturę cieczy

(Rys. 1.1). Warto jednak wspomnieć, że położenia atomów w szkłe nie są całkowicie przypadkowe.

Jak pokazuje rys.1.1, mimo braku dalekozasiegowego uporządkowania charakterystycznego dla kryształu w amorficznym ciecie stałym istnieje duża korelacja w lokalnym ułożeniu atomów - każdy z nich ma określoną ilość najbliższych sąsiadów w niemal identycznej odległości. Szkła mają więc, tak jak kryształy wysoki stopień uporządkowania bliskiego zasięgu, które jest konsekwencją istnienia wiązań chemicznych odpowiedzialnych za ich spójność.¹⁰

W dzisiejszych czasach szkło znajduje zastosowanie we wszystkich dziedzinach życia. Między innymi przy produkcji: opakowań, szyb okiennych, emalii, glazury, włókna szklanego, waty szklanej, czy izolacji cieplnych (szkło piankowe). Materiały amorficzne są także coraz częściej stosowane w optyce, technologiach informatycznych, medycynie oraz przemyśle farmaceutycznym. Produkcja stałych form leków tj. tabletek i kapsulek, w których substancja lecznicza występuje w formie amorficznej stanowi jedno z ważniejszych zadań, jakie stawia przed sobą nowoczesna farmacja. Do zalet przemawiających za amorficznymi postaciami leków należy zaliczyć ich podwyższoną rozpuszczalność i szybkość rozpuszczania, co może z kolei prowadzić do zwiększenia dostępności farmaceutycznej substancji czynnej, a w konsekwencji do poprawy jej biodostępności. Accolate® (zafirlukast), Cefitin® (aksetyl cefuroksymu), Accupril® (chlorowodorek chinaprilu), czy insulina to tylko niektóre przykłady leków dostępnych już na rynku zawierających w składzie amorficzne substancje czynne.¹¹

1.2 Metody otrzymywania materiałów amorficznych

Przez długi czas sądzono, iż w postaci amorficznej można otrzymać tylko ograniczoną liczbę materiałów. Obecnie jednak wiadomo, że zdolność do tworzenia szkła jest niemal uniwersalną własnością materii. Kluczem jest jedynie dobór odpowiedniej metody amorfizacji, takiej która umożliwi skuteczną transformację kryształu do fazy szklistej. Najstarszą a zarazem najbardziej rozpowszechnioną techniką otrzymywania materiałów amorficznych jest izobaryczne chłodzenie cieczy. Zgodnie z teorią D.H. Turnbulla przedstawioną w 1969r *„niemal wszystkie materiały można otrzymać w postaci ciała amorficznego, jeśli zostaną dostatecznie szybko ochłodzone”*.¹² Co oznacza „szybko”? Tak, aby nie dopuścić do uformowania się zarodków krystalizacji. Istotne jest, że tempo chłodzenia jest specyficzną cechą każdej substancji. Przykładowo przeprowadzenie metalu, który charakteryzuje się dużą tendencją do tworzenia regularnej struktury krystalicznej, w postać szkła metalicznego wymaga ochłodzenia układu o około 1000 K w ciągu 1 milisekundy. Tak wysokie tempo schładzania (około 10^6K/s) nie jest konieczne do otrzymania szkła krzemowego, gdzie wystarczająca jest szybkości ochładzania równa 10^{-5}K/s . Oprócz opisanej techniki amorfizacji w celu otrzymania materiału szklistego stosowanych jest również wiele innych metod takich jak izotermiczne ściskanie cieczy, ablacja laserowa czy też resublimacja pary na cienkiej powierzchni (z ang. *vapour deposition*). Możemy tu również wymienić żelowanie oraz wytrącanie materiału amorficznego bezpośrednio z roztworu, podczas których faza amorficzna otrzymywana jest w wyniku reakcji chemicznej, a nie jest wmuszona termicznie jak to miało miejsce we wcześniejszych przykładach.

Z uwagi na to, iż niniejsza praca dotyczy amorficznych materiałów istotnych z farmaceutycznego punktu widzenia, w tym miejscu bardziej szczegółowo omówione zostaną jedynie metody amorfizacji substancji leczniczych.

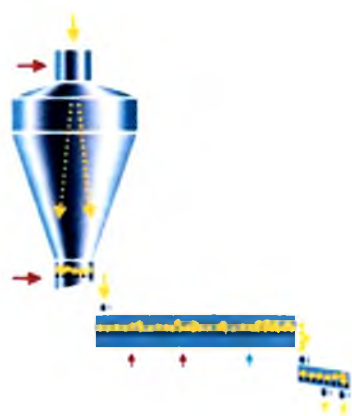
1.2.1 Sposoby amorfizacji substancji leczniczych

Do najpopularniejszych metod otrzymania substancji leczniczej w formie amorficznej stosowanych w przemyśle farmaceutycznym zaliczamy:

- hartowanie stopionej substancji tzw. witrifikacja,
- odparowanie rozpuszczalnika (w tym suszenie rozpyłowe lub liofilizacja),
- mechaniczne mielenie kryształów.

- odwodnienie hydratów.¹³

Pierwszy z powyższych sposobów polega na szybkim przechłodzeniu uprzednio stopionego kryształu (ang. *quench cooling*). Jest to technika najprostsza spośród wymienionych, jednak nie zawsze może zostać zastosowana. Powodem tego jest fakt, iż częstym zjawiskiem towarzyszącym topieniu krystalicznej substancji leczniczej jest jej rozkład chemiczny. Ponieważ z punktu widzenia farmaceuty niezwykle istotna jest czystość substancji leczniczej, obecność nawet niewielkiej ilości produktów degradacji termicznej jednoznacznie dyskwalifikuje witrifikację, jako metodę otrzymania amorficznej postaci leku. Dlatego też, stosowanie tej metody jest ograniczone jedynie do próbek



Rys. 1.2 Przemysłowa suszarka rozpyłowa.

stabilnych chemicznie, w temperaturze topnienia. Niebezpieczeństwa rozkładu amorfizowanej substancji unikamy w przypadku liofilizacji (ang. *freeze drying*) oraz suszenia rozpyłowego (ang. *spray drying*). Cechą wspólną tych technik jest konieczność rozpuszczenia substancji leczniczej. Z kolei różnica tkwi głównie w sposobie odparowania rozpuszczalnika. W przypadku liofilizacji, będącej procesem suszenia sublimacyjnego, rozpuszczalnik usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem w obniżonej temperaturze.¹⁴ Natomiast podczas suszenia rozpyłowego płynną substancję dysperguje się w komorze suszarni, przez którą przepływa jednocześnie gorący czynnik suszący (np. powietrze bądź azot). W efekcie

następuje gwałtowne odparowanie rozpuszczalnika z kropeł (mgły), które w ten sposób zamieniają się w drobiny proszku opadające na dno komory (Rys. 1.2). Opisana metoda jest jedną z najczęściej wykorzystywanych technik otrzymywania amorficznych substancji leczniczych na skalę przemysłową.¹⁵ Głównie dlatego, iż charakteryzuje się stosunkowo niskim (np. w porównaniu do liofilizacji) nakładem energetycznym, a także pozwala na użycie dużej liczby rozpuszczalników lub ich mieszanin, nie wykluczając tych łatwopalnych o niskich temperaturach wrzenia. Pomimo tego, że suszenie rozpyłowe należy do najbardziej uniwersalnych metod wytwarzania układów amorficznych niekiedy technika ta musi zostać zastąpiona przez inną, nie wymagającą rozpuszczenia substancji. Ma to miejsce szczególnie wtedy, gdy lek rozpuszcza się jedynie w odczynniku, który nie został dopuszczony do procedur preformulacyjnych. Najprostszą alternatywą w takich sytuacjach jest mechaniczne mielenie substancji krystalicznej.¹⁶ Technika ta jest powszechnie stosowana

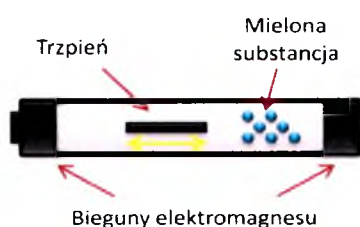
przez firmy farmaceutyczne w celu redukcji wielkości ziaren substancji leczniczych, ponieważ z reguły materiał w postaci mikronowych cząsteczek charakteryzuje się nieco lepszą rozpuszczalnością niż substancja nie poddana rozdrobnieniu. Odpowiedni dobór warunków mielenia tj. m.in. czasu i temperatury procesu może doprowadzić do częściowej bądź całkowitej amorfizacji mikronizowanego materiału. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka rodzajów urządzeń służących do mikronizacji jednak najczęściej wykorzystywanymi



Rys. 1.3 Schemat typowej komory młynka planarnego.

są tzw. młyny kulowe (planarne lub wibracyjne). Proces rozdrabniania następuje w nich na skutek uderzeń kul w mielony materiał oraz poprzez tarcie substancji pomiędzy kulami a ścianami naczynia (Rys. 1.3)¹⁷. Warto zaznaczyć, iż efektywność tego procesu uzależniona jest przede wszystkim od wielkości i ilości kul, częstotliwości ich uderzeń, a także od

stopnia wypełnienia naczynka rozdrabnianym materiałem. – im większy jest stosunek masy kul do masy mielonego proszku tym efektywniejsze rozdrabnianie. Opisywany proces mielenia odbywa się z reguły w temperaturze pokojowej. Jednak w wyniku intensywnego ruchu kul energia termiczna układu rośnie co prowadzi do lokalnych wzrostów temperatury i ogrzewania mielonego materiału. W konsekwencji istnieje niebezpieczeństwo degradacji termicznej rozdrabnianej substancji. Ponadto, dane literaturowe pokazują, że mielenie odbywające się powyżej temperatury zeszklenia mikronizowanego materiału może indukować jego przemiany polimorficzne. Dlatego też, w celu otrzymania czystych substancji amorficznych coraz częściej młyny kulowe zastępuje się kriogenicznymi, w których mielenie odbywa się w temperaturze ciekłego azotu.¹⁸ Mechanizm rozdrabniania materiału w tego typu



Rys. 1.4 Schemat naczynka do mielenia kriogenicznego (firmy Spex).

młynku jest nieco inny niż opisany powyżej, a mianowicie polega na ruchach trzciny, wykonanego z magnetycznej stali nierdzewnej, pomiędzy dwoma biegunami elektromagnesu umieszczonymi na przeciwnych końcach podłużnego naczynka zwanego tubusem (Rys. 1.4).

W odróżnieniu od mielenia kulowego rozdrabniania próbka jest cały czas utrzymywana w niskiej temperaturze co zabezpiecza ją przed przegrzewaniem na skutek energii generowanej podczas ruchów trzciny. Dodatkowo w takich warunkach mielony materiał

staje się bardziej kruchy i twardy co sprawia, że rozdrabnianie kriogeniczne jest szybsze i zdecydowanie bardziej efektywne, niż to przeprowadzane w temperaturze pokojowej.¹⁹ Przykładowo mielenie indapamidu, powszechnie stosowanego leku moczopędnego, w temperaturze pokojowej zapewnia amorfizację materiału po 5 godzinach trwania procesu, podczas gdy kriomielenie prowadzi do zeszklenia próbki zaledwie po 45 minutach.

Przez wiele lat mielenie kriogeniczne uważane było za całkowicie „bezpieczną” metodę amorfizacji. Stanowiło zatem alternatywę dla witrifikacji czy też liofilizacji, które wymagają użycia próbek stabilnych termicznie i chemicznie. Jednak całkiem niedawno badania furosemidu, jednego z podstawowych leków moczopędnych dostępnych na rynku, pokazały że również mielenie w temperaturze ciekłego azotu może aktywować, a nawet przyspieszać, zmiany w strukturze chemicznej mielonego materiału.²⁰ Dlatego też, niezależnie od rodzaju zastosowanej metody, amorficzne farmaceutyki powinny być dokładnie testowane przed rozpoczęciem procesu produkcyjnego.

W niniejszej pracy w celu otrzymania amorficznych form leków przeciwcukrzycowych wykorzystano metody izobarycznego schładzania, izotermicznej kompresji oraz mielenia w warunkach kriogenicznych przy wykorzystaniu młynka o typie 6670 firmy SPEX.

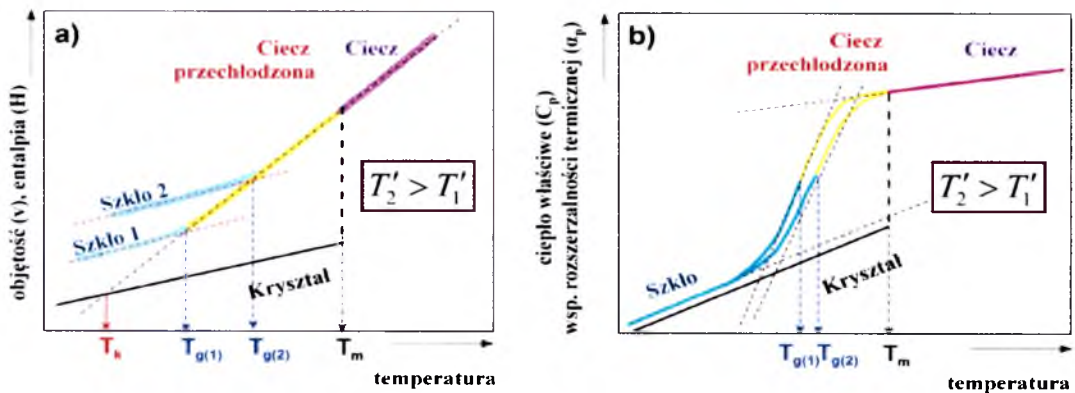
1.3 Fenomenologia przejścia ciecz – szkło

Termodynamiczny i kinetyczny wymiar przejścia między cieczą a szkłem tworzą łącznie jeden z najważniejszych, a zarazem najciekawszych, problemów fizyki fazy skondensowanej. Szczególnie dlatego, iż badania cieczy przechłodzonych oraz przejścia szklanego mają bardzo istotne znaczenie dla wielu dziedzin nauki i techniki. Niestety, mimo wielu lat badań jak dotąd nie istnieje jeden, w pełni zadowalający, opis przejścia do fazy szkła. Podrozdział ten zawiera krótką charakterystykę najważniejszych termodynamicznych i dynamicznych aspektów tego zjawiska przedstawianych w literaturze.

1.3.1 Termodynamiczny aspekt przejścia szklanego

Jak pokazano w poprzednim podrozdziale najprostszą metodą otrzymania materiału amorficznego jest ochłodzenie cieczy znacznie poniżej jej temperatury topnienia w taki sposób, aby uniknąć krystalizacji. Aby dokładniej przeanalizować efekty termodynamiczne towarzyszące schładzaniu substancji od fazy ciekłej, aż do etapu ciała stałego posłużono się

rys. 1.5 przedstawiającym temperaturowe zależności objętości (V) i entalpii (H) (panel a) oraz ich pochodnych tj. współczynnika rozszerzalności termicznej $\alpha_p = V^{-1}(\partial V/\partial T)_p$, i ciepła właściwego $C_p \equiv (dH/dT)_p$ (panel b).

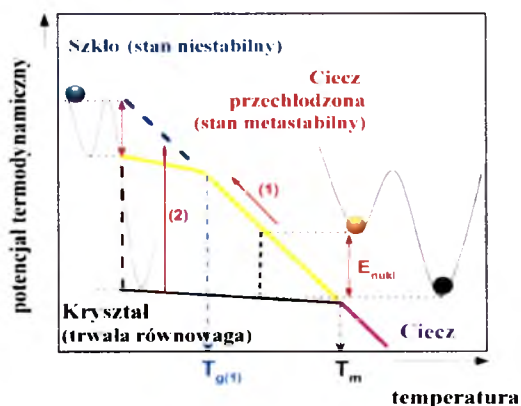


Rys. 1.5 Panel (a) przedstawia schematycznie zależność objętości układu i jego entalpii od temperatury. T_m jest temperaturą topnienia (krystalizacji). Wielkości T_{g1} i T_{g2} oznaczają temperatury przejść szklistych dla dwóch różnych szybkości chłodzenia T_1' i T_2' . Symbol T_K oznacza temperaturę Kauzamnna. Ilustracja zaczerpnięta z pracy [21]. Panel (b) przedstawia temperaturową zależność współczynnika rozszerzalności termicznej α_p oraz ciepła właściwego C_p .

Podczas schładzania większość cieczy zmniejsza w sposób ciągły swoją objętość by w pewnej charakterystycznej temperaturze (T_m) przejść do stanu krystalicznego. Dzieje się tak, przy dostatecznie powolnym tempie chłodzenia $T' = dT/dt$, umożliwiającym powstanie i rozrost zarodków fazy krystalicznej. Ponieważ krystalizacja klasyfikowana jest jako przejście fazowe pierwszego rodzaju zazwyczaj przejawia się nagłym, nieciągłym spadkiem objętości. Jednak znane są również materiały takie jak np. woda, których objętości zwiększa się podczas krystalizacji. Ponieważ proces nukleacji zajmuje pewien czas, przy dostatecznie wysokiej wartości T' , możliwe jest przechłodzenie cieczy poniżej T_m . Dalsze obniżanie temperatury prowadzi do przejścia ciecz-szkło manifestowanego przez charakterystyczną zmianę nachylenia zależności $V(T)$. Poniżej temperatury zeszklenia (T_g), gdzie struktura materiału jest już praktycznie „zamrożona”, obserwujemy jedynie niewielką zmianą objętości próbki towarzyszącą chłodzeniu (małe nachylenie krzywej $V(T)$). Odzwierciedla to fakt, iż wartość współczynnika rozszerzalności termicznej dla ciała stałego (α_p), w tym przypadku szkła, jest mniejsza niż ta wyznaczona dla cieczy przechłodzonej (Rys. 1.5b).⁹

Na pierwszy rzut oka przemiana ciecz-szkło przypomina termodynamiczne przejście fazowe drugiego rodzaju. Spełniony jest bowiem pierwszy warunek Ehrenfesta dotyczący ciągłości pierwszych pochodnych funkcji termodynamicznej Gibbsa, odpowiednio względem

ciśnienia i temperatury, tj. objętości $V = (dG/dp)_T$ i entropii $S = -(dG/dT)_p$, w pobliżu przejścia szklistego. Jednak zmiany współczynnika α_p oraz ciepła właściwego C_p w obszarze zeszklenia nie są skokowe (tzn. nieciągłe), jak być powinno w przejściu fazowym drugiego rodzaju, lecz następują w sposób ciągły w pewnym wąskim zakresie temperatur. W związku z tym często opisuje się fenomenologię przejścia między cieczą, a szkłem jako rozmyte przejście fazowe drugiego rodzaju. Jednak najnowsze dane literaturowe pokazują, iż próby klasyfikowania przejścia szklistego jako termodynamicznej przemiany fazowej nie są do końca poprawne z uwagi na to, że temperatura w jakiej odbywa się zeszklenie zależy od eksperymentalnego tempa chłodzenia - przy powolnym ciecz przechodzi w szkło w temperaturze niższej ($T_{g(1)}$), niż ma to miejsce podczas szybkiego obniżania temperatury ($T_{g(2)}$). Takie zachowanie, zależne od czasu, jest konsekwencją kinetycznej natury procesu witrifikacji.²² Z mikroskopowego punktu widzenia zjawisko formowania się fazy szklistej można opisać następująco. Podczas chłodzenia próbki, gdy czas relaksacji strukturalnej wydłuża się osiągając wartości rzędu kilkuset sekund w pobliżu przejścia szklistego, molekuły cieczy przechłodzonej przegrupowują się, aby osiągnąć nowy stan równowagi. Będzie to możliwe tylko wtedy, gdy czas potrzebny na ich reorganizację okaże się być krótszy, niż skala czasowa związana ze zmianą temperatury. Innymi słowy, przy niewielkim tempie chłodzenia T' cząsteczki będą miały szansę kontynuować przegrupowanie i w konsekwencji osiągną stan równowagi w niższych temperaturach (niższe T_g). W przeciwnym wypadku tj. gdy tempo zmian temperatury będzie wysokie, przegrupowanie molekuł nie będzie kompletne, a co za tym idzie wielkości makroskopowe, takie jak np. objętość, będą różniły się od wartości równowagowych.²³ W tym miejscu warto zwrócić uwagę na fakt, iż wspomniany stan równowagi cząsteczek w fazie przechłodzonej w rzeczywistości nie jest nim w precyzyjnym ujęciu termodynamicznym. Jak pokazuje rys. 1.6 trwała równowaga układu, zapewniana przez minimalną wartość potencjału termodynamicznego (G), możliwa jest jedynie w kryształach.⁶



Rys. 1.6 Temperaturowa zależność potencjału termodynamicznego (G) w warunkach izobarycznych. Ścieżka (1) przedstawia zmiany energii towarzyszące standardowej metodzie otrzymywania fazy szklistej tj. witrifikacji, podczas gdy (2) oznacza przejście do stanu szkła np. z użyciem metody mielenia. Rysunek zaczerpnięto z pracy [6].

Ciecz przechłodzona jest natomiast w równowadze metastabilnej. Jeśli podczas chłodzenia próbki zaczną się w niej tworzyć zarodki krystalizacji oznacza to, że energia nukleacji E_{nukl} , będąca barierą potencjału termodynamicznego oddzielającą metastabilny stan cieczy przechłodzonej od równowagowego kryształu, jest w tym przypadku niewielka. Jednak dopóki w cieczy przechłodzonej nie uformują się zarodki krystalizacji można ją traktować jako układ równowagowy. Z kolei szkło jest generalnie układem termodynamicznie niestabilnym, charakteryzującym się największą wartością energii swobodnej Gibbsa. Oznacza to, że jego molekuly ulegają bardzo wolnym, ciągłym przegrupowaniom, dążąc do osiągnięcia energetycznego minimum lokalnego. Chociaż układ amorficzny nie jest stanem termodynamicznie równowagowym wiele materiałów może utrzymywać się w nim bardzo długo. Tego typu substancje stanowią najwrażliwszy obiekt badań procesów towarzyszących tworzeniu się fazy szkła. Problemem pozostaje jedynie ustalenie punktu, dla którego można by uznać strukturę cieczy za zamrożoną. Metody eksperymentalne najczęściej wykorzystywane do wyznaczenia temperatury zeszklenia oparte są na pomiarach dylatometrycznych i kalorymetrycznych. W dylatometrii mierzymy temperaturową zależność objętości (jak na rys. 6a), a za temperaturę przejścia szklatego przyjmujemy punkt przecięcia prostych pochodzących z ekstrapolacji zależności $V(T)$ w fazie ciekłej i szklistej. W analogiczny sposób wartość T_g można otrzymać z pomiarów kalorymetrycznych, ponieważ temperaturowa zależność entalpii wykazuje podobny charakter co linia $V(T)$.²⁴ Alternatywna metoda wyznaczenia T_g oparta jest na analizie temperaturowych zależności pochodnych $V(T)$ i $H(T)$. Temperatura zeszklenia jest wtedy definiowana jako ta przy której obserwuje się nagły wzrost C_p i α_p podczas grzania substancji, z reguły z tempem 10 K/min. Jednak przejście szkliste przejawia się nie tylko w zmianach pierwszej i drugiej pochodnej funkcji stanu ale również w zachowaniu dynamiki molekularnej badanego układu. Biorąc pod uwagę kinetyczną naturę procesu witrifikacji naturalne wydaje się być definiowanie temperatury przejścia szklatego w kategorii czasów relaksacji strukturalnej.

1.3.2 Przejście do fazy szklistej a dynamika molekularna

Spowolnienie dynamiki molekularnej w pobliżu przejścia szklatego jest jedną z charakterystycznych cech cieczy przechłodzonych. Ustającym ruchom cząsteczkowym towarzyszy gwałtowny wzrost dynamicznych własności cieczy takich jak współczynnik dyfuzji, lepkość η oraz czas relaksacji strukturalnej τ_α . W zakresie temperatur T_m - T_g

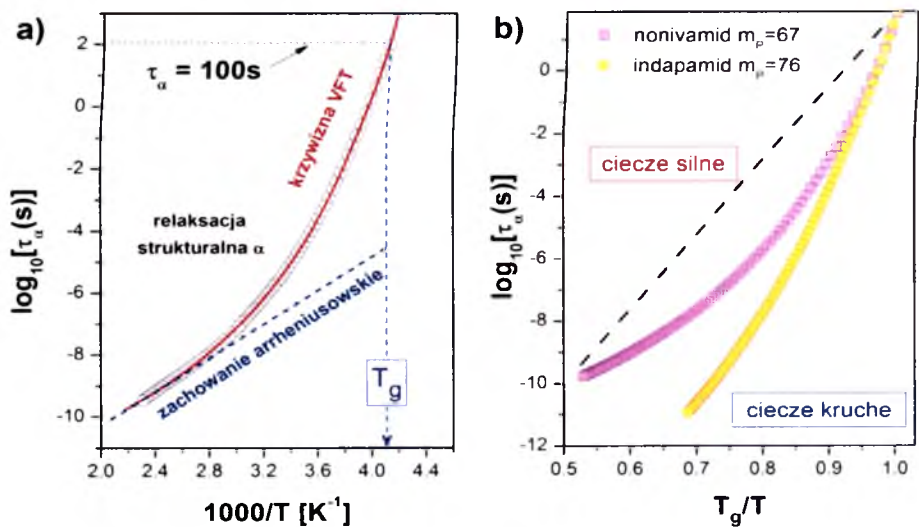
parametry te mogą ulegać zmianie nawet o 15 rzędów wielkości. Przykładowo czas relaksacji strukturalnej, potrzebny do przegrupowania cząsteczek typowej cieczy wydłuża się od wartości rzędu pikosekund (w pobliżu T_m) aż do setek sekund w pobliżu temperatury przejścia szklanego. Pogląd, iż ciecz w temperaturze zeszklenia charakteryzuje stały czas relaksacji równy 100s (co odpowiada lepkości dynamicznej równej 10^{12} Pa·s), stał się podstawą umownej dynamicznej definicji temperatury przejścia szklanego²⁵.

Wiele danych eksperymentalnych pokazuje, że zarówno czas relaksacji strukturalnej jak i lepkość zmieniają się podczas chłodzenia w pewien charakterystyczny sposób. A mianowicie nachylenie krzywej $\log\tau_\alpha(1/T)$ (lub $\log\eta(1/T)$) staje się coraz większe wraz z obniżaniem temperatury (Rys. 1.7a). Wśród wielu modeli zaproponowanych do opisu tego niearrheniusowskiego zachowania najczęściej stosowane jest równanie Vogela-Fulchera-Tammanna (VFT).^{26,27,28}

$$\tau_\alpha = \tau_\infty \exp\left(\frac{A}{T - T_0}\right)$$

1.1

gdzie A jest stałą charakterystyczną dla danej cieczy. Z kolei T_0 oznacza temperaturę „idealnego” przejścia szklanego, odpowiadającą nieskończenie długim czasom relaksacji strukturalnej. Temperatura T_0 w przybliżeniu równa jest temperaturze Kauzmanna, poniżej której ekstrapolowana wartość entropii cieczy przechłodzonej byłaby niższa niż entropia kryształu.



Rys. 1.7 Panel (a) przedstawia temperaturową nieareniusowską zależność czasów relaksacji strukturalnej, podczas gdy na panel (b) stanowi tzw. wykres Angella skonstruowany dla dwóch różnych substancji farmaceutycznych: indapamidu i nonivamidu.

Badania dynamiki molekularnej cieczy tworzących fazę szklaną pokazują, że odstępstwo czasów relaksacji α od zachowania arrheniusowskiego jest specyficzną cechą każdego materiału. Ciecze wykazujące prawie liniową temperaturową zależność τ_α (lub η), zgodnie z terminologią zaproponowaną przez Angella, nazywane są *silnymi* (ang. *strong*), podczas gdy te, dla których wykres $\tau_\alpha(T)$ zbliżony jest do modelu Arrheniusa określane są mianem *kruche* (ang. *fragile*).²⁹ W celu przyporządkowania cieczy do jednej z powyższych grup można wykorzystać tzw. wykres Angella tj. zależność $\log \tau_\alpha(T_g/T)$ (Rys. 1.7b). Z kolei, aby ilościowo określić odchylenie τ_α i η od liniowego przebiegu często stosuje się tzw. parametr kruchości dynamicznej m_p definiowany jako nachylenie stycznej do wykresu funkcji $\log \tau_\alpha(T_g/T)$ w punkcie T_g .³⁰

$$m_p = \left. \frac{d \log \tau_\alpha}{d(T_g/T)} \right|_{T=T_g} \quad 1.2$$

Zazwyczaj przyjmuje się, że materiały dla których parametr kruchości nie przekracza 30 należą do cieczy *silnych*, podczas gdy *kruchymi* nazywamy te o wartościach m_p powyżej 100. Większość substancji farmaceutycznych badanych do tej pory mieści się pomiędzy tymi dwoma skrajnymi przypadkami, przyjmując z reguły wartości rzędu 50-90 dla T_g definiowanego jako $\tau_\alpha = 100s$. np. indapamid ($m_p=76$), nonivamid ($m_p=67$)³¹, indometacyna ($m_p=83$)³², ibuprofen ($m_p=87$)³³, telmisartan ($m_p=87$)³⁴ czy glibenklamid ($m_p=78$)³⁵.

Intensywny wzrost czasów relaksacji strukturalnej oraz lepkości obserwowany jest również w przypadku cieczy poddanych izotermicznej kompresji. Ponieważ z dynamicznego punktu widzenia zarówno obniżenie temperatury jak i wzrost ciśnienia prowadzą do spowolnienia dynamiki molekularnej obydwie te parametry termodynamiczne mogą być uważane za równoważne. Niemniej jednak warto nadmienić, że temperatura wpływa głównie na wzbudzenie rotacyjnych i translacyjnych stanów energetycznych materii, podczas gdy ciśnienie powoduje znaczne zmniejszenie odległości międzymolekularnych. Dlatego też, w badaniach izotermicznych relaksacja strukturalna rozważana jest głównie jako proces aktywowany objętościowo^{36,37}:

$$\tau_\alpha = \tau_0 \exp\left(\frac{P\Delta V}{RT}\right) \quad 1.3$$

gdzie ΔV oznacza objętość aktywacji, τ_0 jest wartością τ_α w ciśnieniu atmosferycznym natomiast R to stała gazowa. ΔV będąca miarą objętości niezbędnej do zmiany położenia cząstki, jest bardzo przydatnym parametrem charakteryzującym procesy relaksacyjne cieczy

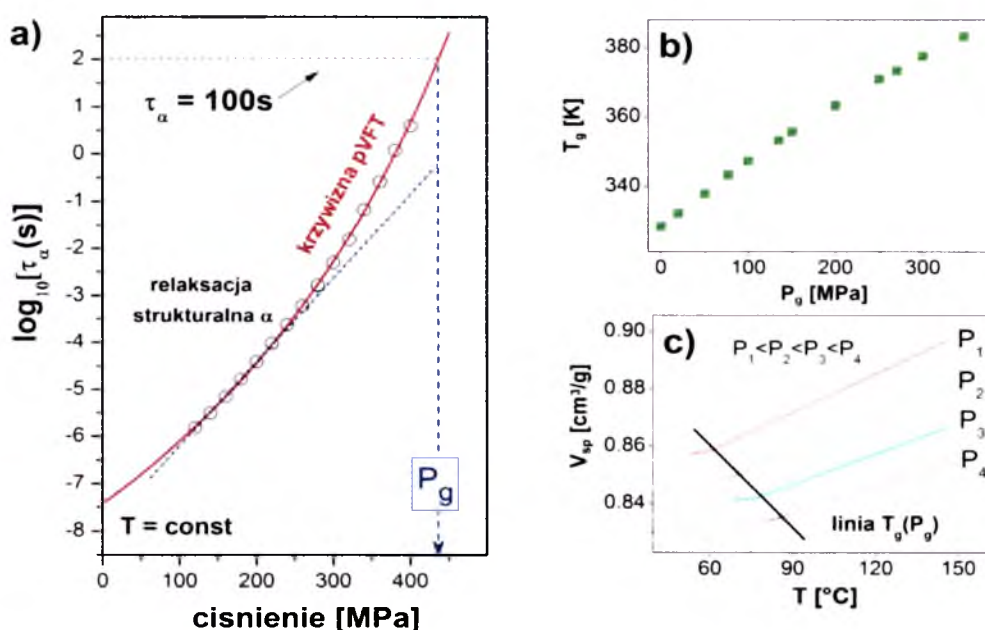
tworzących fazę szklaną. Można ją wyznaczyć bezpośrednio z nachylenia linii $\log \tau_\alpha(P)$ przemnożonego przez stałą R, temperaturę kompresji oraz wartość $\ln 10$ (tj. 2.303):

$$\Delta V^\# = RT \ln(10) \left(\frac{\partial \log \tau_\alpha}{\partial P} \right)_T \quad 1.4$$

Procedura ta może zostać zastosowana jedynie wtedy, gdy czasy relaksacji strukturalnej badanej cieczy przechłodzonej zmieniają się liniowo z ciśnieniem. Jeśli tak nie jest oznacza to, że objętość aktywacji rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Zachowanie to jest analogiczne do zmian energii aktywacji w pobliżu T_g w pomiarach izobarycznych. Ponieważ zdecydowana większość cieczy wykazuje nieliniową zależność $\log \tau_\alpha(P)$ (Rys. 1.8a) do opisu izotermicznych danych relaksacyjnych stosuje się tzw. ciśnieniowe równanie VFT:³⁸

$$\tau_\alpha = \tau_0 \exp \left(\frac{D_P P}{P_0 - P} \right) \quad 1.5$$

gdzie D_P i P_0 są jedynie funkcjami temperatury (czasy relaksacji $\tau_\alpha \rightarrow \infty$ w ciśnieniu P_0). Zakładając, że ściskana substancja przechodzi do fazy szklistej wtedy, gdy czas relaksacji strukturalnej osiąga 100s, z izotermicznej zmiany τ_α można wyznaczyć wartość ciśnienia zeszklenia P_g . Z kolei na podstawie serii tego typu badań możliwe jest wykreślenie ciśnieniowej zależności T_g . Jak pokazuje rys. 1.8b wartość T_g rośnie nieliniowo podczas ściskania próbki. Zgodnie z modelem swobodnej objętości zachowanie to tłumaczone jest wzrostem upakowania molekuł indukowanym przez ciśnienie. Ponieważ kompresja próbki nierozłącznie wiąże się ze zwiększeniem jej gęstości, a co za tym idzie spadkiem objętości, zależność $T_g(P_g)$ możemy wyznaczyć również na podstawie danych dylatometrycznych zarejestrowanych w różnych warunkach ciśnieniowych (Rys. 1.8c).



Rys. 1.8 Panel (a) przedstawia przykładową ciśnieniową, niearrheniusowską zależność czasów relaksacji. Panel (b) ilustruje zależność temperatury zeszklenia od ciśnienia wyznaczoną dla chlorowodoru werapamilu (VH).³⁹ Z kolei panel (c) to wykres zależności objętości od temperatury otrzymany w różnych warunkach izobarycznych przy pomocy metody dylatometrycznej. Linia wskazująca zmianę nachylenia $V(T)$ ilustruje zmianę T_g z ciśnieniem, która może być przedstawiona w postaci wykresu analogicznego do tego przedstawionego na panelu (b).

Kiedy skala czasowa relaksacji strukturalnej drastycznie rośnie, niezależnie od tego czy ma to miejsce na skutek obniżania temperatury czy wzrostu ciśnienia, układ przechodzi do fazy szkła, a jego dynamika molekularna zostaje zdominowana przez relaksacje drugorzędowe. Pomimo, iż badania tych procesów trwają od kilkudziesięciu lat, to wciąż pozostają jednym z najbardziej kontrowersyjnych zagadnień dotyczących szkieł.

Obecnie uważa się, że źródłem relaksacji drugorzędowych mogą być zarówno procesy intra- jak i intermolekularne odzwierciedlające odpowiednio ruchliwość fragmentów cząsteczek oraz ograniczone reorientacje całych molekuł, przy czym zjawiska mające międzycząsteczkowe pochodzenie nazywa się z reguły relaksacjami typu Johari-Goldstein (JG) (od nazwisk badaczy, którzy jako pierwsi zaobserwowali proces drugorzędowy w cieczach małowcząsteczkowych)^{40,41}. Aby określić naturę procesów drugorzędowych można posłużyć się modelem sprzężeniowym (ang. *extended coupling model (CM)*) zaproponowanym przez K.L. Ngai, zgodnie z którym relaksację drugorzędową możemy

zaklasyfikować jako JG jeśli jej czas relaksacji τ_{JG} odpowiada tzw. czasowi prymitywnej relaksacji τ_p wyznaczonym z równania:^{42,43}

$$\tau_p = t_c^{1-\beta_{KWW}} \tau_\alpha^{\beta_{KWW}} \quad 1.6$$

gdzie t_c jest pewnym charakterystycznym, niezależnym od temperatury mikroskopowym czasem relaksacji, poniżej którego molekuly relaksują niezależnie od siebie. Wartość t_c wyznaczona metodą kwazielastycznego rozpraszania neutronów dla cieczy małowielkościowych wynosi około 2 pikosekund^{44,45}. Parametr β_{KWW} jest z kolei wykładnikiem w funkcji Kohlrausha, Williamsa i Wattsa (KWW)^{46,47}:

$$\phi(t) = \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_\alpha} \right)^{\beta_{KWW}} \right] \quad 1.7$$

opisującej szeroki rozkład czasów relaksacji strukturalnej. W zależności od wartości parametru β_{KWW} , który przyjmuje wartości z przedziału $0 < \beta_{KWW} \leq 1$, rozkład czasów relaksacji odpowiadający funkcji KWW może obejmować wiele rzędów wielkości. W przypadku, gdy proces relaksacyjny β nie spełnia kryterium podanego w równaniu 1.7, zwykle jest krótszy niż czas prymitywnej relaksacji τ_p , jego pochodzenia upatruje się raczej w reorientacji pewnych grup atomów w cząsteczce, niż w ruchach całych molekuł.

W ostatnich latach pokazano również, że klasyfikację procesów drugorzędowych do jednej z grup „*true-JG*” lub „*non-JG*” ułatwiają badania relaksacyjne w warunkach wysokiego ciśnieniowego. Dane zgromadzone dla szeregu cieczy tworzących fazę szklaną pokazują, iż w przeciwieństwie do procesu o charakterze intramolekularnym, typowa relaksacja „*non-JG*” jest praktycznie nieczuła na zmiany ciśnienia.^{48,49}

2 METODY ANALIZY FIZYKOCHemicznej AMORFICZNYCH FARMACEUTYKÓW

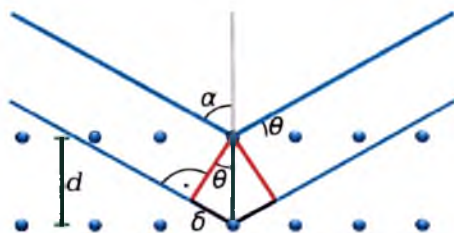
Współczesne, rygorystyczne standardy jakości narzucone firmom farmaceutycznym sprawiają, że każdy lek na etapie badań preformulacyjnych poddawany zostaje wnikliwej analizie fizykochemicznej. Gdy substancja czynna tabletki występuje w formie amorficznej, badania te są nieco bardziej skomplikowane, niż ma to miejsce w przypadku preparatu krystalicznego. Nie wystarczą bowiem standardowe pomiary czystości czy rozpuszczalności badanej substancji. Konieczne staje się zastosowanie dodatkowych technik instrumentalnych umożliwiających podanie stopnia amorficzności analizowanej próbki, wykonanie jej charakterystyki kalorymetrycznej czy też określenie tendencji układu do rekrytalizacji. Dlatego też, jako wyposażenie laboratoriów postaci leków coraz częściej oprócz chromatografów czy tabletkarek pojawiają się dyfraktometry, kalorymetry różnicowe, czy też różnego rodzaju spektrometry.

W niniejszej pracy wiodącą techniką eksperymentalną zastosowaną w celu przeprowadzenia charakterystyki fizykochemicznej grupy amorficznych leków przeciwcukrzycowych jest szerokopasmowa spektroskopia dielektryczna (BDS). Dlatego też, podstawy teoretyczne tej metody badawczej opisane zostaną bardziej szczegółowo, w porównaniu z pozostałymi technikami, których zasady pomiarowe będą przedstawione jedynie w zarysie. Metody te, a mianowicie proszkowa rentgenografia strukturalna (XRPD), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), spektroskopia w podczerwieni (FT-IR), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) oraz chromatografia cieczowa (HPLC) zostały wykorzystane jako techniki pomocnicze, uzupełniające ograniczenia spektroskopii dielektrycznej. Zastosowanie tak różnorodnych metod eksperymentalnych umożliwiło rozwiązanie problemów badawczych podjętych w niniejszej pracy.

2.1 Analiza strukturalna i skład chemiczny farmaceutyków

2.1.1 Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

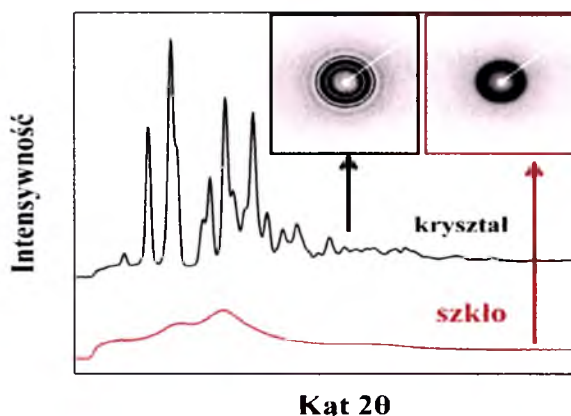
Powszechnie wiadomo, iż podstawą badań strukturalnych ciał stałych są metody dyfrakcyjne takie jak rentgenografia, neutronografia, czy elektronografia. Jednak najpopularniejszą z nich jest technika oparta na zjawisku dyfrakcji promieni X. W laboratoriach przemysłu farmaceutycznego, gdzie przeważającą większość badanych materiałów stanowią próbki polikrystaliczne, najczęściej stosowana jest proszkowa dyfrakcja rentgenowska (ang. *X-ray powder diffraction, XRPD*). XRPD jest obecnie jedną z najpopularniejszych technik stosowanych do opisu własności strukturalnych materii skondensowanej m.in. rozkładu atomów w sieci krystalicznej lub amorficznej, długości wiązań, czy amplitudy drgań atomów. W metodzie tej wiązka monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego pada na badany materiał umieszczony w szklanej rurce kapilarnej.⁵⁰ Wśród wielu ziaren proszku, o statystycznej orientacji przestrzennej, znajdą się i takie, w których dla pewnej rodziny płaszczyzn krystalograficznych spełniony będzie warunek Bragga, wiążący geometrię kryształu z długością fali padającego promieniowania (λ) i kątem (θ), pod którym obserwowane jest interferencyjne maksimum, $2d \sin\theta = n\lambda$ ⁵¹.



Rys. 2.1 Graficzna interpretacja teorii dyfrakcji promieni rentgenowskich.

Promienie ugięte na jednej rodzinie płaszczyzn tworzą stożek powstający w wyniku równomiernego rozłożenia odbijających krystalitów w stosunku do osi padającej wiązki. Następną rodziną płaszczyzn wyznacza stożek o innym kącie rozwarcia (inna odległość d). Wynikiem pomiaru jest więc grupa stożków widzianych jako prążki w obrazie dwuwymiarowym, bądź refleksy dyfrakcyjne o różnej intensywności na dyfraktogramie (Rys. 2.2). Sytuacja taka ma miejsce wtedy, gdy badaną próbką jest materiał krystaliczny. W przypadku próbki amorficznej, charakteryzującej się brakiem tzw. periodyczności translacyjnej zapewniającej stałą odległość między atomami następuje zanik refleksów Bragga pochodzących od poszczególnych płaszczyzn. Zamiast tego dyfraktogram rentgenowski substancji amorficznej stanowi tzw. szerokie „halo” amorficzne.

W konsekwencji na dyfraktogramie dwuwymiarowym brak jest również charakterystycznych dla kryształu prążków dyfrakcyjnych (Rys. 2.2).¹¹



Rys. 2.2 Dyfraktogram rentgenowski, czyli wykres zależności intensywności rozpraszania od kąta odbicia 2θ (lub odległości międzypłaszczyznowej d).

Proszkowa dyfrakcja rentgenowska jest jedną z prostszych metod pozwalającą w szybkim czasie określić ilościowo stopień amorficzności badanego materiału. Dlatego też, jest to metoda niezwykle użyteczna w trakcie badań preformulacyjnych amorficznych postaci leków. Jej główną zaletą jest łatwość przygotowania próbki do pomiarów jak również to, że jest to metoda niedestruktywna, umożliwiającą wykorzystanie badanej substancji w dalszych eksperymentach. Jej dodatkową zaletą jest stosunkowo niski poziom detekcji frakcji krystalicznej w badanym materiale amorficznym wynoszący kilka procent.

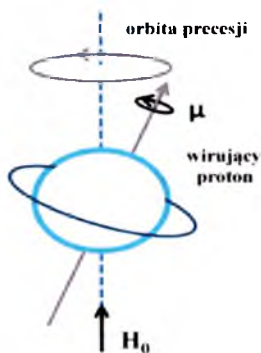
Dyfraktogramy XRD przedstawione w niniejszej pracy zarejestrowane zostały za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego D/max RAPID II-R japońskiej firmy Rigaku. Z uwagi na to iż natężenie promieniowania rozpraszanego przez substancje amorficzne jest znacznie słabsze w porównaniu z substancjami krystalicznymi, aby zwiększyć strumień fotonów rentgenowskich, w układzie pomiarowym zastosowano lampę z wirującą srebrną anodą zasilaną z generatora o mocy 18 kW. Dyfraktometr wyposażony jest również w monochromator grafitowy, dwukołowy goniometr w układzie omega - 2 theta, układ kolimatorów oraz detektor w postaci płyty obrazowej.

2.1.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Szybki rozwój metod rezonansowych, jaki nastąpił w ostatnich latach, sprawił iż techniki te uważane są za jedno z najważniejszych metod badania struktury cząsteczek. Znajdują one zastosowanie do identyfikacji zarówno prostych związków organicznych jak i wielkocząsteczkowych produktów pochodzenia syntetycznego i naturalnego, w tym również farmaceutyków. Spośród metod rezonansowych najczęściej i najchętniej stosowanymi w analizie strukturalnej związków organicznych są techniki magnetycznego rezonansu protonowego ^1H NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) oraz węglowego ^{13}C NMR. Do ich zalet zalicza się łatwość przygotowania próbki, wymaganą niewielką ilość badanego materiału (nawet rzędu μg) oraz krótki czas rejestrowania widma.⁵²

Obiektem badań spektroskopii NMR są jądra atomowe o niezerowym spinie jądrowym S oraz momencie magnetycznym μ . Współczynnik proporcjonalności między tymi dwiema wielkościami fizycznymi γ , zwany giromagnetycznym, jest ważną cechą charakterystyczną danego jądra:

$$\mu = \gamma S \quad 2.1$$



Rys. 2.3 Precesja protonu w stałym polu magnetycznym

W warunkach równowagi, tj. przy braku zewnętrznego pola magnetycznego, badany układ charakteryzuje się całkowicie izotropowym rozkładem kierunków jądrowych momentów magnetycznych. Z kolei wraz z pojawieniem się zewnętrznego pola magnetycznego o natężeniu H_0 zdeteminowany jest pewien wyróżniony kierunek, wokół którego spiny wykonują precesję z charakterystyczną częstością (zwaną częstością Larmora) zależną od H_0 i rodzaju jądra (Rys. 2.3). Gdy do jądra wirującego w stałym polu magnetycznym dostarczymy energię $h\nu$, równą różnicy energii między jego dwoma sąsiednimi poziomami spinowymi,

$$h\nu = \Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} H_0 \quad 2.2$$

zostaje ona zaabsorbowana przez jądro powodując zmianę jego poziomu energetycznego. Jedynym warunkiem absorpcji jest zrównanie częstości działającego promieniowania ν z częstością precesji. A zatem, aby wywołać przejścia pomiędzy sąsiednimi poziomami energetycznymi potrzebne jest promieniowanie elektromagnetyczne o częstości:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} H_0 \quad 2.3$$

zwanej powszechnie częstością rezonansową. Powyższe równanie, będące warunkiem jądrowego rezonansu magnetycznego, jest zarazem podstawowym równaniem spektroskopii NMR.⁵³

Absorpcję promieniowania przez protony w warunkach rezonansu można wykryć i zarejestrować elektronicznie w postaci widma, którego każdy element dostarcza informacji na temat struktury badanego związku. A mianowicie:

- Intensywność pasm uzyskana z krzywej całkowania umożliwia dokładne określenie całkowitej liczby protonów w cząsteczce badanej substancji oraz ilość protonów w poszczególnych jej fragmentach.
- Przesunięcie chemiczne pasma w widmie, definiowane jako:

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_{wz}}{\nu_0} \cdot 10^6 \quad [ppm] \quad 2.4$$

gdzie: ν_s - częstość rezonansowa danego jądra w analizowanej próbce,

ν_{wz} - częstość rezonansowa danego jądra w próbce wzorcowej,

ν_0 - częstość podstawowa spektrometru.

związane jest z otoczeniem protonu wywołującego sygnał. Jeśli proton jest silnie przesłaniany przez otaczające go ekranujące elektrony, to jego sygnał uzyskuje się przy wyższym natężeniu pola (z prawej strony widma). Z kolei jeśli sąsiednie atomy odciągają elektrony otaczające proton, to jest on silnie odsłaniany, a jego sygnał pojawi się przy niższym natężeniu pola.

- W wyniku wzajemnych magnetycznych oddziaływań pomiędzy protonami znajdującymi się przy sąsiednich atomach węgla, następuje rozszczepienie sygnałów na grupę pasm tworzące tzw. multiplet. Przy czym liczba linii w multiplecie dla n jąder sprzęgających się z jednakową stałą wynosi:

$$M = 2nI + 1 \quad 2.5$$

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego, dzięki stosunkowo łatwej interpretacji uzyskanych wyników, znalazły liczne zastosowania. Oprócz ustalenia i potwierdzenia struktury cząsteczki metody NMR stosowane są również do określania składu ilościowego mieszanin oraz równowag tautomerycznych. W niniejszej pracy technika rezonansu jądrowego wykorzystana została w celu zbadania chemicznej stabilności analizowanych leków jak również w celu określenia procentowego udziału izomerów w analizowanych farmaceutykach. Badania wykonane zostały na spektrometrze Spektrometr Bruker Avance 400 MHz.

2.1.3 Spektroskopia w podczerwieni (FT-IR)

Spektroskopia w podczerwieni (ang. *infrared spectroscopy IR*) jest metodą umożliwiającą identyfikację grup funkcyjnych badanego związku, między innymi C=O, C=N czy O-H. Ponieważ nie zdarza się aby dwie różne substancje, nie będące enancjomerami, miały identyczne widma w podczerwieni, technika ta jest również niezawodna w celu potwierdzenia lub wykluczenia identyczności struktur chemicznych dwóch analizowanych materiałów.

W opisywanej metodzie badawczej próbkę, w stanie stałym bądź ciekłym, poddaje się działaniu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu $14300 - 200 \text{ cm}^{-1}$. Jednak największe znaczenie w badaniach struktury związków organicznych ma tzw. obszar podczerwieni właściwej (ang. *mid infrared MIR*) $4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$. Absorpcja tego typu promieniowania powoduje zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczek. Jednak z uwagi na to, iż energia wzbudzeń oscylacyjnych jest w przybliżeniu dwukrotnie większa od energii wzbudzeń rotacyjnych widma IR ciał stałych i cieczy nazywane są z reguły widmami oscylacyjnymi. Ich cechą charakterystyczną jest występowanie szeregu pasm absorpcji, z których każde odpowiada wzbudzeniu innego rodzaju drgań własnych molekuly tj. takich które nie powodują przemieszczenia się środka masy cząsteczki ani jej obrotu. Drgania te mają zazwyczaj różne częstotliwości i są wzajemnie ortogonalne tzn. niezależne od siebie. W zależności od tego, czy dominuje w nich zmiana długości wiązań, czy też zmiana kątów między wiązaniami, rozróżnia się drgania rozciągające (walencyjne ang. *stretching*, ν) i zginające (deformacyjne, ang. *bending*), wśród których możemy wyróżnić oscylacje nożycowe (ang. *scissoring*, δ), wachlarzowe (ang. *wagging*, ω), wahadłowe (ang. *rocking*, ρ) oraz skręcające (ang. *twisting*, τ). Stosuje się także podział drgań na drgania w płaszczyźnie i poza płaszczyzną cząsteczki lub grupy atomów. Z kolei kierując się kryterium symetrii rozróżniamy drgania symetryczne i asymetryczne.^{54,55}

Analiza tysięcy widm w podczerwieni pokazała, iż bardzo często, niezależnie od rodzaju badanej substancji, pasma absorpcji odpowiadające określonym ugrupowaniom atomów występują w tym samym wąskim przedziale częstotliwości, noszącym nazwę częstotliwości grupowej. Na tej podstawie stworzono tabele ułatwiające interpretację widma w podczerwieni. Dzięki nim można przypisać pasma absorpcji charakterystyczne dla danego widma odpowiadającym im grupom atomów. Ponieważ jednak często zdarza się, iż charakterystyczne zakresy absorpcji różnych grup funkcyjnych pokrywają się, pojawienie się pasma IR w danym rejonie nie stanowi jeszcze dostatecznego dowodu na obecność

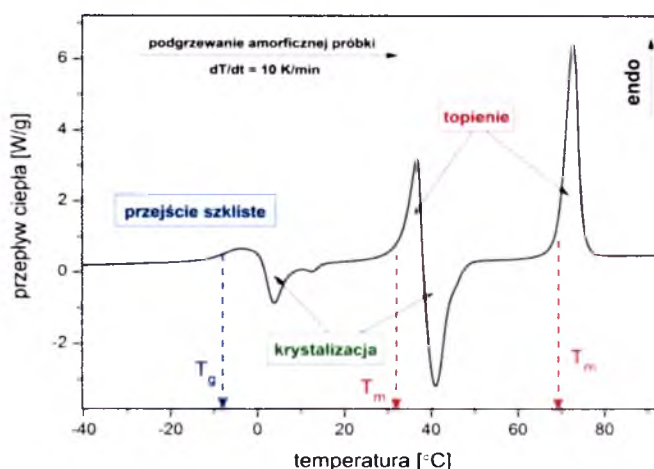
odpowiadającego mu ugrupowania atomów. Pewniejsze jest wnioskowanie odwrotne tj. brak pasma absorpcji utożsamiany z brakiem odpowiedniej grupy funkcyjnej w molekułe badanego związku organicznego.⁵⁶

W niniejszej pracy badania IR leków przeciwcukrzycowych przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru fourierowskiego FTS6000 Bio-Rad (zakres pomiarowy $16000 \div 20 \text{ cm}^{-1}$) z mikroskopem podczerwieni UMA500 (zakres $4000 \div 740 \text{ cm}^{-1}$); wyposażenie: przystawka fotoakustyczna, diamentowa przystawka ATR MIRacle, polaryzator, przystawki temperaturowe do pomiarów w zakresie 80-800 K.

2.2 Badania kalorymetryczne

Badania kalorymetryczne (kalorymetria z łac. *calor* = ciepło) dostarczają wielu cennych informacji o termodynamicznym przebiegu różnorodnych procesów chemicznych i fizycznych wywołanych zmianą temperatury. Dzięki nim można z łatwością identyfikować skład fazowy substancji, dokonywać pomiarów entalpii oraz badać kinetykę i mechanizmy szeregu skomplikowanych reakcji. Pozwalają one również określić trwałość termiczną materiałów oraz zdefiniować tendencję układu szklistego do rekrytalizacji w różnych warunkach termicznych. Dlatego też, metody kalorymetryczne są podstawowymi technikami charakteryzującymi amorficzne substancje lecznicze na etapie badań preformulacyjnych.

Jedną z najpopularniejszych technik termoanalitycznych jest skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *differential scanning calorimetry*, DSC). W metodzie tej próbkę badaną i wzorcową, w której nie zachodzą żadne przemiany temperaturowe (najczęściej jest nią puste naczynko tzw. tygiel), ogrzewa się w jednakowych warunkach, mierząc różnicę temperatur między nimi. Jeśli w badanym materiale, w trakcie analizy, zajdzie przemiana egzotermiczna (np. krystalizacja) to jego temperatura będzie przewyższać temperaturę próbki referencyjnej. Odwrotną sytuację będziemy obserwować w przypadku przemiany endotermicznej (np. podczas topnienia materiału). Wyniki pomiaru rejestrowane są w postaci termogramu będącego wykresem zależności ilości ciepła dostarczonego lub odprowadzonego z badanej próbki (w mW lub W/g) w funkcji temperatury (ewentualnie czasu).⁵⁷ Na rys. 2.4 przedstawiono przykładowy termogram DSC zarejestrowany podczas ogrzewania substancji amorficznej.



Rys. 2.4 Przykładowy termogram DSC otrzymany podczas ogrzewania amorficznej substancji leczniczej o działaniu przeciwnadciśnieniowym.

Na jego podstawie można:

- określić wartość temperatury zeszklenia T_g badanego materiału amorficznego (na podstawie charakterystycznego skoku ciepła właściwego),
- opisać tendencje układu do rekrytalizacji w szerokim zakresie temperatur,
- wyznaczyć wartość temperatury topnienia substancji krystalicznej,
- otrzymać ilościowe dane o przemianach cieplnych w analizowanej substancji, w tym wartości entalpii topnienia ΔH_m i krystalizacji ΔH_k oraz ciepła właściwego ΔC_p .

Ponadto skaningowa kalorymetria różnicowa umożliwia:

- wyznaczenie stopnia amorficzności badanej próbki – korzystając ze wzoru:

$$w_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_{100\%}} \cdot 100\% \quad 2.6$$

gdzie: ΔH – ciepło topnienia wyznaczone podczas grzania amorficznej próbki, $\Delta H_{100\%}$ – ciepło topnienia materiału całkowicie krystalicznego,

- badanie kinetyki reakcji krystalizacji w warunkach izotermicznych,
- badanie przemian polimorficznych,
- określenie procentowej zawartości wody w badanej próbce.

Z uwagi na przedstawiony powyżej wachlarz możliwości jakie daje technika DSC oraz fakt, iż do badań wymagana jest jedynie niewielka ilość substancji metoda ta jest bardzo często wykorzystywana podczas analiz amorficznych substancji leczniczych. Coraz częściej w przemyśle farmaceutycznym stosuje się również inne techniki będące odmianą

konwencjonalnego DSC, takie jak np. modulowane temperaturowo DSC (ang. *temperature modulated DSC*, MTDSC)⁵⁸. Metoda ta umożliwia odseparowanie procesów termodynamicznych, które przebiegają równocześnie np. parowanie rozpuszczalnika przysługujące przejście szkliste. Jest to szczególnie istotne w przypadku materiałów amorficznych mających z reguły dużą zdolność sorpcji wilgoci bądź takich, które zawierają w swoim składzie rozpuszczalniki organiczne będące pozostałością syntezy chemicznej.

Analiza termiczna amorficznych leków przeciwcukrzycowych przedstawiona w niniejszej pracy wykonana została przy pomocy kalorymetru firmy Mettler-Toledo wyposażonego system chłodzenia ciekłym azotem oraz ceramiczny czujnik temperatury składający się ze 120 termopar.

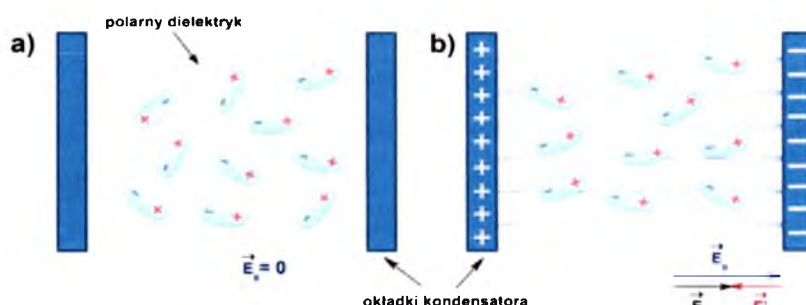
2.3 Badania dynamiki molekularnej amorficznych leków w funkcji temperatury i ciśnienia

Badania dynamiki molekularnej układów tworzących fazę szklistą stanowią obecnie jedno z najciekawszych zagadnień fizyki fazy skondensowanej. Powodem tego jest nie tylko chęć pogłębiania wiedzy na temat przejścia ciesz-szkło, ale również względy praktyczne. W ostatnim dziesięcioleciu zagadnienie ruchliwości molekularnej było szczególnie często eksplorowane przez naukowców zajmujących się amorficznymi substancjami leczniczymi. Uważa się bowiem, iż cząsteczkowa mobilność (zarówno globalna jak i lokalna) jest niezwykle istotnym czynnikiem determinującym stabilność leków w stanie amorficznym. Dlatego też, kompleksowa charakterystyka dynamiki molekularnej faz przechłodzonej i szklistej substancji leczniczych, w różnych warunkach termodynamicznych, ma kluczowe znaczenie dla projektowania i produkcji amorficznych farmaceutyków o pożądanej stabilności.

2.3.1 Podstawy teoretyczne spektroskopii dielektrycznej (BDS)

Niezwykle użyteczną techniką badawczą umożliwiającą rejestrowanie ruchów relaksacyjnych molekuł cieczy przechłodzonych i szkieł w zmieniających się warunkach termodynamicznych, tj. temperatury i ciśnienia, jest szerokopasmowa spektroskopia dielektryczna (ang. *broadband dielectric spectroscopy*, BDS). Istotą tej metody jest badanie efektów związanych z oddziaływaniem zewnętrznego, zmiennego pola elektrycznego z badaną substancją i pomiar wielkości charakteryzujących reakcję układu na przyłożone

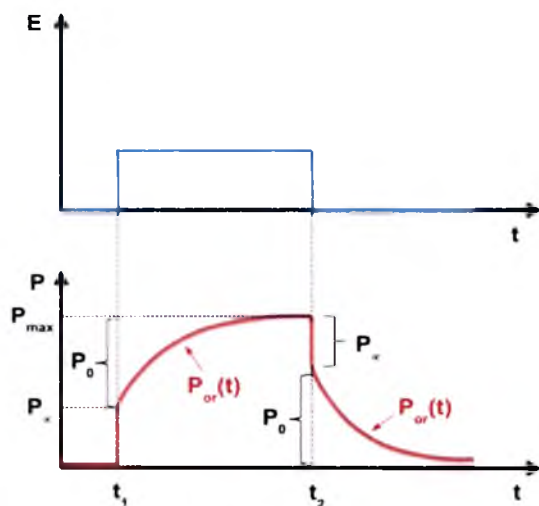
pole. Jak sama nazwa wskazuje przedmiotem badań tego rodzaju spektroskopii są dielektryki, czyli materiały nie przewodzące prądu elektrycznego. Z mikroskopowego punktu widzenia substancje te można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich to dielektryki niepolarne, których symetryczne molekuly nie posiadające trwałego momentu dipolowego (np. H_2 , CH_4). Natomiast drugą grupę stanowią dielektryki polarne, których cząsteczki są elektrycznie asymetryczne tzn. posiadają trwały moment dipolowy. Bez względu na to, czy cząsteczki mają trwałe elektryczne momenty dipolowe, czy też nie, po umieszczeniu ich w zewnętrznym polu elektrycznym zyskują dodatkowo tzw. *indukowane momenty dipolowe*. Powstają one na skutek deformacji chmury elektronowej atomów (tzw. polaryzacja elektronowa, P_e) oraz w wyniku zmiany położenia atomów lub jonów w przestrzeni (polaryzacja atomowa, P_a) pod wpływem pola. Dodatkowo, w przypadku, kiedy cząsteczki dielektryka są dipolami, a równocześnie mają swobodę orientacji (dotyczy to przede wszystkim gazów i cieczy) wkład do indukowanego momentu dipolowego daje również polaryzacja dipolowa (orientacyjna P_{or}) polegająca na częściowej orientacji molekuł wzdłuż linii sił pola. Schematyczne ułożenie dipoli w dielektryku przed i po włączeniu zewnętrznego pola przedstawia rys. 2.5.⁵⁹



Rys. 2.5 (a) Cząsteczki obdarzone elektrycznym momentem dipolowym przy braku zewnętrznego pola elektrycznego mają przypadkowe ustawienia. (b) przyłożenie pola elektrycznego prowadzi do częściowego uporządkowania dipoli.

Rozważmy teraz w jaki sposób zmieniają się makroskopowe parametry polarnego dielektryka w momentach nagłego włączania i wyłączania zewnętrznego pola elektrycznego. Praktycznie natychmiast po włączeniu pola elektrycznego narasta polaryzacja indukcyjna (deformacyjna) P_{∞} , będąca sumą polaryzacji elektronowej i atomowej. Natomiast polaryzacja orientacyjna P_{or} , dopiero po upływie pewnego czasu osiąga wartość maksymalną (P_0). Z podobną sytuacją mamy do czynienia po wyłączeniu pola zewnętrznego - podczas gdy polaryzacja indukcyjna znika równie szybko jak się pojawiła, zanik polaryzacji orientacyjnej jest rozciągnięty w czasie. W konsekwencji układ molekularny potrzebuje pewnego czasu aby

powrócić do stanu równowagi. Zmiany polaryzacji dielektryka pod wpływem prostokątnego impulsu pola elektrycznego $E(t)$ przedstawia rys. 2.6.⁶⁰



Rys. 2.6 Czasowe zmiany polaryzacji dielektryka polarnego wywołane prostokątnym impulsem pola elektrycznego E . P_x oznacza polaryzację indukcyjną, P_{or} – orientacyjną z kolei P_0 jest maksymalną wartością polaryzacji orientacyjnej, a P_{max} maksymalną wartością polaryzacji całkowitej.

Opisane powyżej zjawisko powolnego narastania i zaniku polaryzacji orientacyjnej w czasie nosi nazwę *relaksacji dielektrycznej*. Istnieje kilka modeli opisujących procesy relaksacyjne. Najprostszym z nich jest model Debye'a, którego założeniem jest, że oddziaływania pomiędzy cząsteczkami dielektryka są na tyle małe, że można je pominąć. W takiej sytuacji odpowiedź układu na przyłożone pole elektryczne można opisać za pomocą eksponencjalnej funkcji relaksacji $\Phi(t) \approx \exp(-t/\tau_D)$, w której stała czasowa τ_D nosi nazwę czasu relaksacji dielektrycznej i jest makroskopowym parametrem opisującym własności dynamiczne dielektryka. A zatem zanik polaryzacji orientacyjnej dielektryka można przedstawić jako:

$$P_{or}(t) = (P_0 - P_\infty) \left(1 - e^{-t/\tau_D}\right) \quad 2.7$$

co stanowi rozwiązanie następującego równania różniczkowego:

$$\tau_D \frac{dP_{or}(t)}{dt} = P_0 - P_\infty - P_{or}(t) \quad 2.8$$

gdzie czas relaksacji τ_D określa tempo reorientacji dipoli układu.

Obok analizy zmian polaryzacji w czasie inną, o wiele bardziej rozpowszechnioną, metodą jest badanie polaryzacji układu w funkcji częstotliwości. Wektor polaryzacji można wówczas przedstawić jako:

$$P^*(\omega) = \varepsilon^*(\omega) E(\omega) \quad 2.9$$

Występujący w powyższym wzorze parametr $\varepsilon^*(\omega)$ nosi nazwę zespolonej przenikalności dielektrycznej:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad 2.10$$

Jego część rzeczywista $\varepsilon' = C/C_0$ (gdzie C oznacza pojemność kondensatora z dielektrykiem) to tzw. dyspersja dielektryczna, natomiast część urojona, $\varepsilon'' = 1/\omega RC_0$ reprezentuje absorpcję dielektryczną zwaną również stratami dielektrycznymi. W tym miejscu warto zaznaczyć, iż obie wielkości ε' oraz ε'' powiązane ze sobą równaniami Kramersa-Kroninga:⁶¹

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{u \varepsilon''(u)}{u^2 - \omega^2} du \quad 2.11$$

$$\varepsilon''(\omega) = -\frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\omega [\varepsilon'(u) - \varepsilon_\infty]}{u^2 - \omega^2} du \quad 2.12$$

gdzie u jest zmienną całkowania, wyrażają tę samą funkcję relaksacji.

Zależna od czasu eksponencjalna funkcja relaksacji dla modelu Debye'a w dziedzinie częstości przyjmuje następującą postać:

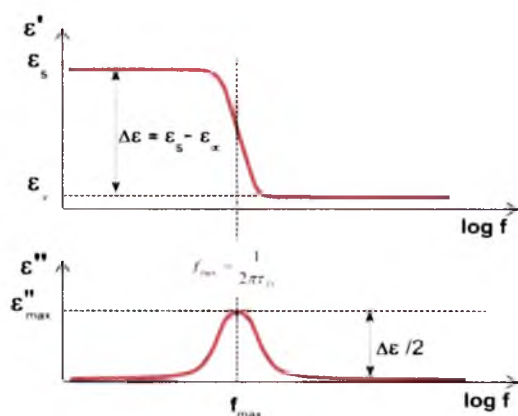
$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau_D} \quad 2.13$$

Z kolei jej składowe, rzeczywistą i urojoną, możemy zapisać jako:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_D)^2} \quad 2.14$$

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)\omega\tau_D}{1 + (\omega\tau_D)^2} \quad 2.15$$

W obydwu równaniach ε_∞ oznacza wysokoczęstotliwościową przenikalność dielektryczną substancji, z kolei ε_s jest statyczną przenikalnością dielektryczną. Łatwo zauważyć, że kiedy $\omega \rightarrow 0$ $\varepsilon' \rightarrow \varepsilon_s$, z kolei ε'' osiąga wartość maksymalną dla $\omega\tau_D = 1$, natomiast $\varepsilon' \rightarrow \varepsilon_\infty$ dla $\omega \rightarrow \infty$ (tzn. dla $\omega\tau_D \gg 1$). Rzeczywista i urojona część zespolonej przenikalności dielektrycznej, w funkcji częstości $f = \omega/2\pi$, została przedstawiona graficznie na rys. 2.7.⁶²



Rys. 2.7 Schematyczne przedstawienie wykresu dyspersji $\varepsilon'(f)$ i absorpcji $\varepsilon''(f)$ dla procesu relaksacyjnego spełniającego równanie Debye'a.

Jak łatwo zauważyć na powyższym rysunku, w domenie częstotliwościowej, urojona część zespolonej przenikalności dielektrycznej ma kształt pik, którego maksimum jest odwrotnością makroskopowego czasu relaksacji τ_D .

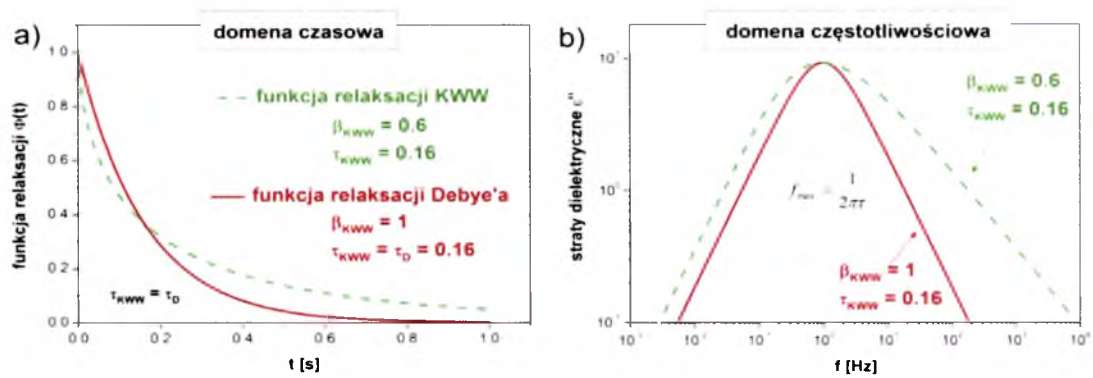
Jak już wspomniano wcześniej przedstawiony powyżej model Debye'a opisujący relaksację dielektryczną polarnych molekuł, stworzony został dla przypadku w którym można pominąć oddziaływania pomiędzy dipolami. Ponieważ jednak w wielu ośrodkach molekularnych interakcje międzycząsteczkowe nie mogą zostać zaniedbane, model ten okazuje się być niewystarczający do opisu złożonych procesów relaksacyjnych tych układów. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku cieczy przechłodzonych, dla których obserwuje się wyraźne nieeksponencjalne zachowanie funkcji relaksacji. Dlatego też, procesy relaksacyjne w materiałach tworzących fazę szklaną, w domenie czasowej opisuje się funkcją zaproponowaną przez Kohlrausha, Williamsa i Wattsa (KWW):

$$\Phi(t) = \exp\left[-(t / \tau_{KWW})^{\beta_{KWW}}\right] \quad 2.16$$

gdzie τ_{KWW} jest czasem relaksacji, a wykładnik β_{KWW} , zwany parametrem poszerzenia eksponencjalnego, przyjmuje wartości z przedziału $0 < \beta_{KWW} \leq 1$. W sytuacji gdy $\beta_{KWW} = 1$ otrzymujemy eksponencjalną funkcję relaksacji Debye'a ($\tau_{KWW} = \tau_D$). W tym miejscu warto wspomnieć, że funkcja KWW stosowana jest nie tylko do analizy danych w domenie czasowej, ale także, o wiele częściej, do opisu widm pochodzących z eksperymentów częstotliwościowych. Aby przekształcić funkcję KWW z domeny czasowej do częstotliwościowej stosuje się następującą transformatę Laplace'a :

$$\frac{\varepsilon^*(\omega) - \varepsilon_\infty}{\Delta\varepsilon} = L\left[-\frac{d\phi(t)}{dt}\right] = \int_0^\infty e^{-i\omega t} \left[-\frac{d\phi(t)}{dt}\right] dt \quad 2.17$$

Przykładowy wynik transformacji funkcji eksponencjalnej oraz takiej, dla której parametr $\beta_{KWW}=0.6$, został przedstawiony na rys. 2.8b. W obydwu przypadkach czas relaksacji τ_{KWW} jest ten sam i wynosi 0.16s. Jednak z uwagi na fakt, iż dla funkcji KWW w domenie częstotliwościowej czas relaksacji τ , wyznaczony z częstotliwości maksymalnej strat dielektrycznych f_{\max} , nie jest tożsamy z τ_{KWW} ($\tau \approx \tau_{KWW} e^{-0.60607(\beta_{KWW}-1)} \cdot 63$), w celu dokładnego porównania kształtów obydwu krzywych absorpcji, funkcję relaksacji KWW przesunięto tak, aby jej maksimum pokrywało się z maksimum funkcji Debye'a.



Rys. 2.8 Przykłady funkcji relaksacji Debye’a i funkcji KWW ($\beta_{KWW}=0.6$) o tych samych czasach relaksacji τ_{KWW} w domenie czasowej (a) oraz po transformacji do dziediny częstotliwości (b).

Łatwo zauważyć, że nieeksponecjalny przebieg funkcji relaksacji w domenie czasowej w reprezentacji częstotliwości objawia się znacznym poszerzeniem krzywych $\epsilon''(f)$ w stosunku do modelu Debye’a. Dlatego też, funkcja KWW jest często wykorzystywana do opisu kształtu relaksacji strukturalnej cieczy tworzących szkliwa. Jednakże, z uwagi na fakt, iż nie istnieje analityczna postać funkcji KWW w dziedzinie częstotliwości, jej stosowanie jest utrudnione. Z tego względu do opisu krzywych $\epsilon'(\omega)$ oraz $\epsilon''(\omega)$ wygodniej jest stosować funkcję zaproponowaną w 1967 roku przez Havriliaka i Negami:^{64,65}

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\Delta\epsilon}{[1 + (i\omega\tau_{HN})^\alpha]^\beta} \quad 0 \leq \alpha < 1 \text{ oraz } 0 < \beta \leq 1 \quad 2.18$$

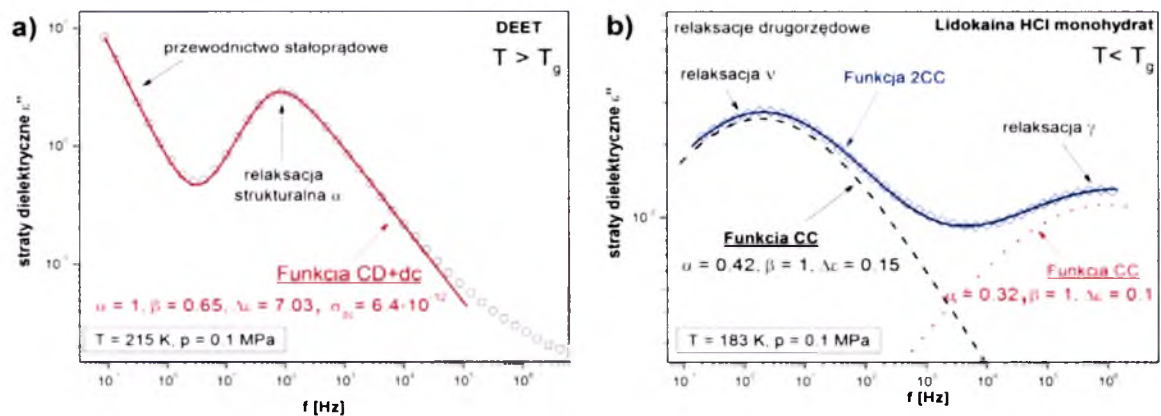
Występujące w powyższym równaniu wykładniki α i β są parametrami odpowiednio symetrycznego i asymetrycznego poszerzenia krzywej strat dielektrycznych. Przy czym współczynnik α opisuje niskoczęstotliwościowy fragment krzywej absorpcji $\epsilon''(\omega)$ z kolei skrzydło wysokoczęstotliwościowe tj. gdy $f \gg f_{max}$ charakteryzuje iloczyn parametrów kształtu α i β stanowiący współczynnik kierunkowy liniowej zależności $\log \epsilon'' = f(\log f)$. Jeżeli obydwa wykładniki potęgowe są równe jedności otrzymujemy przedstawione wcześniej równanie Debye’a (2.13) opisujące wąski i symetryczny pik strat dielektrycznych.

Duża ilość danych eksperymentalnych dyskutowana w literaturze pokazuje, iż dla większości cieczy niskomolekularnych kształt niskoczęstotliwościowego skrzydła procesów relaksacyjnych, obserwowanych powyżej temperatury zeszklenia, można opisać funkcją HN z parametrem α równym jedności. Co oznacza, że dla tych materiałów równanie HN redukuje się do funkcji Cole-Davidson (CD).^{66,67} Z kolei kształt relaksacji drugorzędowych w większości przypadków można sparametryzować funkcją Cole-Cole (CC)⁶⁸, w której parametrem równym 1 jest wykładnik β . W tym miejscu warto również nadmienić, iż

eksperymentalne widma dielektryczne $\varepsilon''(f)$ cieczy przechłodzonych, w zakresie niskich częstotliwości, bardzo często charakteryzuje wkład przewodnictwa stałoprądowego, pochodzący od translacyjnego ruchu jonów obecnych w objętości badanej próbki. Ponadto wielokrotnie zdarza się, iż dane $\varepsilon''(f)$, rejestrowane poniżej temperatury zeszklenia, wykazują obecność więcej niż jednego procesu relaksacyjnego. W tych przypadkach widma dielektryczne są zazwyczaj opisywane poprzez superpozycję odpowiednio wkładu przewodnictwa stałoprądowego oraz obserwowanego procesu relaksacyjnego, lub kilku procesów relaksacyjnych, co można zapisać jednym ogólnym równaniem⁶⁰:

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{\sigma_{dc}}{\varepsilon_0 \omega} + \sum_{i=1}^n \left(\varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta \varepsilon_i}{[1 + (i\omega\tau_i)^\alpha]^\beta} \right) \tag{2.19}$$

gdzie człon $\sigma/\varepsilon_0\omega$ opisuje przewodnictwo stałoprądowe, σ – przewodnictwo właściwe, natomiast suma funkcji HN jest wykonywana po n procesach relaksacyjnych obserwowanych na widmie strat dielektrycznych. Wynik dopasowania funkcji HN do przykładowych danych eksperymentalnych przedstawia rys. 2.9.



Rys. 2.9 Wynik dopasowania funkcji Cole-Davidson uwzględniającej wkład przewodnictwa stałoprądowego do danych eksperymentalnych zarejestrowanych dla owadobójczej substancji o nazwie DEET (a) oraz funkcji będącej złożeniem dwóch równań Cole-Cole do danych dielektrycznych zarejestrowanych poniżej temperatury zeszklenia chlorowodorku lidokainy, leku znieczulającego (b).

Jak łatwo zauważyć na rys. 2.9a funkcja HN daje najlepsze dopasowanie do punktów eksperymentalnych w przedziale około 4-5 dekad częstotliwości. Z kolei w obszarze wysokich częstotliwości obserwuje się znacznie szybszy spadek funkcji niż linia punktów pomiarowych. Takie zachowanie obserwowane jest w większości cieczy tworzących fazę szklaną.

Wykorzystując parametry dopasowania funkcji HN do danych eksperymentalnych α , β oraz τ_{HN} można również dokładnie wyznaczyć czas relaksacji τ będący odwrotnością częstotliwości położenia maksimum strat dielektrycznych f_{max} ⁶⁰:

$$\tau = \tau_{HN} \left[\sin \left(\frac{(1-\alpha)\pi}{2\beta+2} \right) \right]^{-\frac{1}{\alpha}} \left[\sin \left(\frac{(1-\alpha)\beta\pi}{2\beta+2} \right) \right]^{\frac{1}{\alpha}} \quad 2.20$$

Na koniec warto nadmienić, iż parametry funkcji HN, opisujące kształt krzywej strat dielektrycznych, powiązane są z parametrem poszerzenia eksponencjalnego β_{KWW} równaniem zaproponowaną przez Colmenero i współpracowników⁶⁹:

$$\alpha_{HN} \cdot \beta_{HN} \equiv \beta_{KWW}^{1.23} \quad 2.21$$

2.3.2 BDS - technika pomiarowa

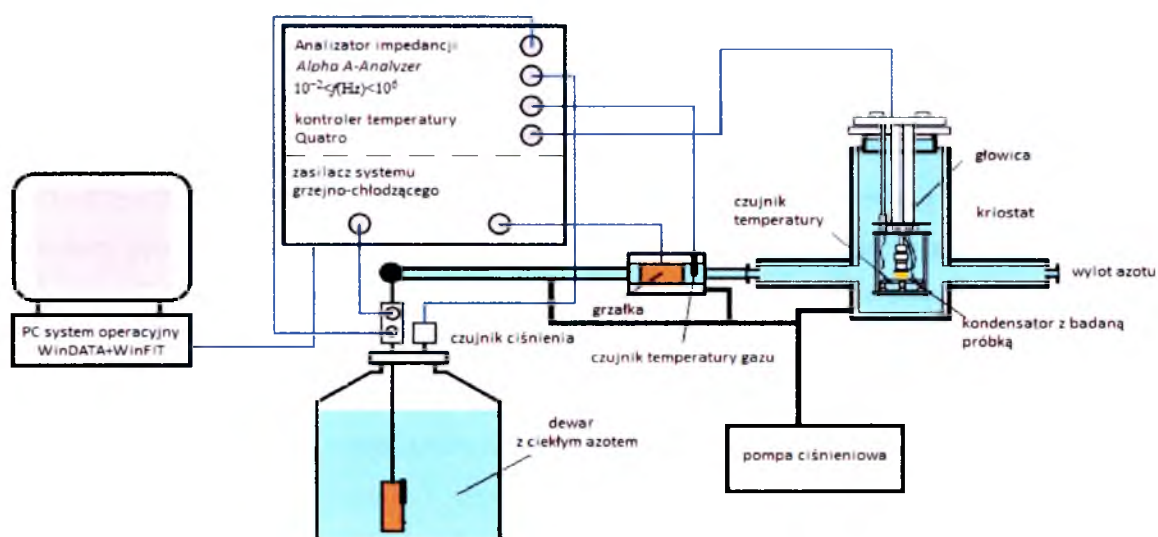
Dielektryczne badania temperaturowe i ciśnieniowe amorficznych leków przeciwcukrzycowych przedstawione w niniejszej pracy wykonane zostały za pomocą szerokopasmowego spektrometru firmy Novocontrol.⁷⁰ Pomiary zespolonej przenikalności dielektrycznej $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$ w ciśnieniu atmosferycznym wykonano w przedziale częstotliwości $10^{-2} < f(\text{Hz}) < 10^9$ z kolei widma dielektryczne w wysokim ciśnieniu zarejestrowano w nieco węższym zakresie częstości $10^{-2} < f(\text{Hz}) < 10^6$. W obydwu przypadkach badany materiał umieszcza się pomiędzy dwiema okładkami kondensatora, do których następnie przykładane jest zmienne napięcie $U_s^*(\omega)$. Stosunek napięcia $U_s^*(\omega)$ przyłożonego do kondensatora z próbką i natężenia prądu $I_s^*(\omega)$ przepływającego przez próbkę to tzw. zespolona impedancja próbki $Z_s^*(\omega) = U_s^* / I_s^*$ powiązana z zespoloną przenikalnością dielektryczną $\varepsilon^*(\omega)$ następującą relacją:⁷¹

$$\varepsilon^*(\omega) = - \frac{i}{\omega Z_s^*(\omega) C_0} \quad 2.22$$

A zatem, zespoloną przenikalność dielektryczną $\varepsilon^*(\omega)$ otrzymujemy poprzez pomiar impedancji $Z_s^*(\omega)$, przy jednoczesnej znajomości pojemności pustego kondensatora $C_0 = \varepsilon_0 S/d$, która zależy od jego geometrii (S – pole powierzchni okładki, d – odległość między okładkami, ε_0 – przenikalność dielektryczna próżni).

Stanowisko do pomiarów $\varepsilon^*(\omega)$ w funkcji temperatury w zakresie niskich częstości przedstawione zostało schematycznie na rys. 2.10 Kondensator ($\phi=20\text{mm}$, $d=0.1\text{mm}$

wykonany ze stali nierdzewnej) wraz z badanym materiałem instaluje się w głowicy połączonej z analizatorem impedancji (*Alpha-A*) – układem umożliwiającym pomiar zespolonej impedancji próbki. Jak pokazuje rys. 2.10 głowicę umieszcza się w kriostacie połączonym z dewarem wypełnionym ciekłym azotem. Dzięki temu próbka podczas pomiaru znajduje się w atmosferze azotu. Stabilizację temperatury w zakresie -150°C - 400°C , z dokładnością 0.1 K, zapewnia regulator Quatro. Wszystkie pomiary zespolonej przenikalności dielektrycznej w ciśnieniu atmosferycznym są sterowane i rejestrowane za pomocą programu WinDATA. Z kolei analizy uzyskanych wyników polegające na opisie kształtu pików relaksacyjnych oraz wyznaczeniu czasów relaksacji wykonywane były za pomocą programu WinFIT firmy Novocontrol, stworzonego specjalnie do tego typu zadań.



Rys. 2.10 Schemat budowy stanowiska do pomiarów dielektrycznych w ciśnieniu atmosferycznym. Rysunek zaczerpnięto z pracy [72].

W przypadku pomiarów wysokoczęstotliwościowych $10^6 < f(\text{Hz}) < 10^9$ zastosowano powyższy układ pomiarowy, w którym analizator impedancji Alfa zastąpiono analizatorem wysokoczęstotliwościowym (HP 4291A RF Impedance Analyser). Zastosowano również specjalną głowicę i kondensator z okładkami o średnicy 5mm. Dystans między okładkami, wynoszący 0.05mm, zapewniają dwa równolegle ułożone włókna szklane.

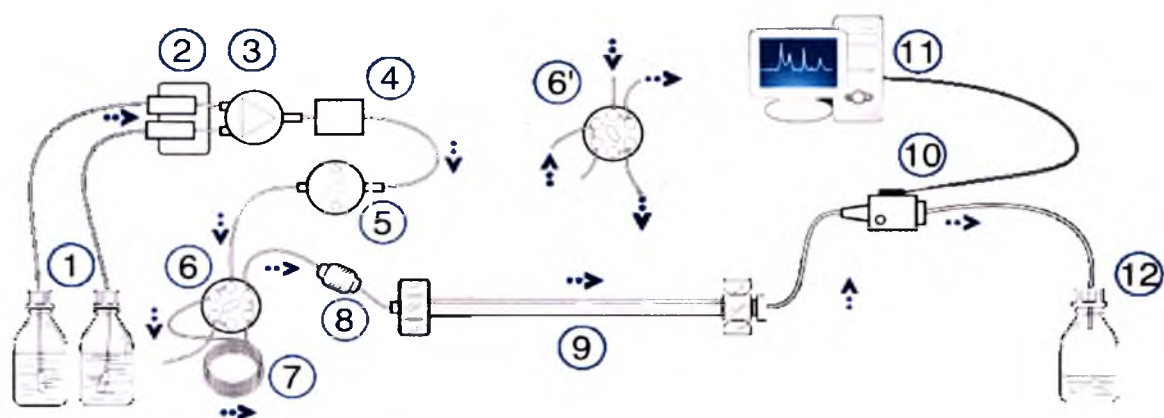
W badaniach ciśnieniowych wykorzystywano system pracujący w zakresie ciśnień 0.1 – 400 MPa), który składa się z prasy hydraulicznej oraz komory ciśnieniowej, wypełnionej olejem silikonowym, połączonych ze sobą systemem kapilar. Kondensator wraz z badaną próbką, przymocowany do korka ciśnieniowego (przez który przepuszczono przewody elektryczne) zanurzono następnie w komorze ciśnieniowej. Pomiar ciśnienia

wykonywany jest przy pomocy czujnika tensometrycznego (Nova Swiss) współpracującego z cyfrowym czytnikiem ciśnienia. Z kolei stabilizację temperatury, z dokładnością do 0.1 K, zapewnia termostat firmy Julabo.

2.4 Pomiary czystości i rozpuszczalności farmaceutyków metodą HPLC

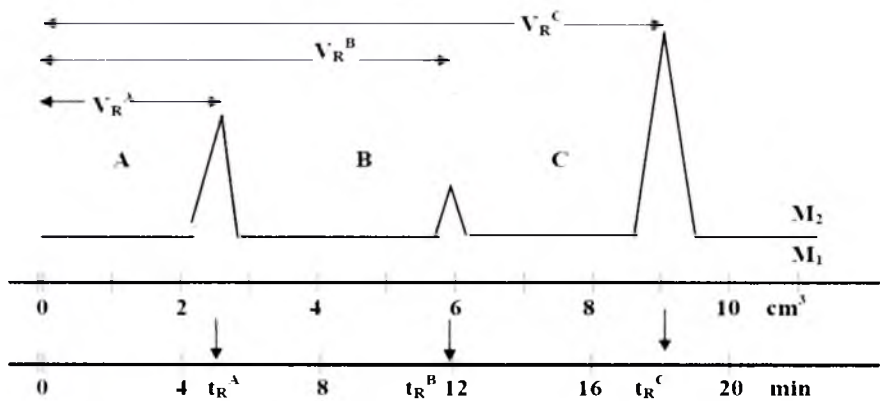
Chromatografia jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej, a w analizie związków organicznych zajmuje pozycję lidera. Zapewnia ona możliwość identyfikacji substancji oraz ich ilościowej analizy, nawet w niskich stężeniach w obecności innych związków. Możliwość rozdzielania chromatograficznego substancji wynika z faktu, że poszczególne składniki próbki w niejednakowym stopniu ulegają podziałowi między dwie nie mieszające się fazy, przy czym jedna z tych faz jest ruchoma (tzw. eluent), a druga nieruchoma (tzw. faza stacjonarna). Znanych jest wiele różnorodnych wariantów chromatografii umożliwiających rozdział mieszanin cieczy i gazów. Ze względu na kształt złoża chromatografię można podzielić na kolumnową i planarną. Pod względem warunków prowadzenia rozdziału na gazową i cieczową. A także pod względem mechanizmu rozdzielania na absorpcyjną, jonowymienną, podziałową, wykluczenia oraz powinowactwa. Istotne znaczenie ma także sposób prowadzenia procesu rozdzielania oraz sposób przemieszczania mieszaniny wzdłuż kolumny wypełnionej fazą stacjonarną.⁷³

Metody chromatograficzne mają różnorodne zastosowanie w wielu działach przemysłu m.in. w farmacji, gdzie najczęściej wykorzystuje się możliwości wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Technika ta umożliwia wykonanie analiz jakościowych i ilościowych zarówno farmaceutyków, półproduktów do ich syntezy (kontrola jakości) jak i materiału pochodzenia biologicznego (monitorowanie poziomu stężenia substancji leczniczych, składu płynów ustrojowych, surowców, ekstraktów itp.). Metodą tą przeprowadza się również badania rozkładu substancji czynnych podczas przechowywania leków, na podstawie których ustala się terminy ważności substancji farmaceutycznych. Przy pomocy chromatografii cieczowej prowadzi się również wiele analiz fitochemicznych, służących do standaryzacji i badania trwałości leków roślinnych.



Rys. 2.11 Schemat chromatografu HPLC. 1-zbiornik fazy ruchomej, 2-odpowietrzacz, 3-zawór dozujący rozpuszczalnik, 4-dozownik fazy ruchomej, 5- pompa wysokociśnieniowa, 6-dozownik, 7-pętla, 8-prekolumna, 9-kolumna, 10-detektor (UV-VIS, spektroskopii masowej), 11-rejestrator, 12-zlewki.

Na rys. 2.11 przedstawiono schemat chromatografu cieczowego. Faza stacjonarna znajduje się w metalowej kolumnie przez którą płynie faza ruchoma tłoczona, zazwyczaj pod wysokim ciśnieniem (rzędu 0.5 – do 40 MPa), przy pomocy pompy. Badaną mieszaninę wprowadza się na kolumnę przy pomocy specjalnego dozownika. Mieszanina substancji rozdziela się na kolumnie i pierwszy składnik wędrujący najszybciej wpływa do detektora. W chwili pojawienia się substancji w detektorze (zmiana stężenia), reaguje on zmianą napięcia elektrycznego, które po wzmocnieniu jest rejestrowane. Rejestrator zapisuje wszystkie zmiany stężenia kolejno pojawiających się, rozdzielonych substancji w kolumnie, w postaci serii pików, które nazywamy chromatogramem. Chromatogram, przedstawiony schematycznie na rys. 2.12, można traktować jako zależność stężenia substancji od czasu trwania analizy, lub objętości fazy ruchomej przepływającej przez kolumnę.



Rys. 2.12 Przykładowy chromatogram z naniesioną objętością V_R oraz czasem retencji t_R . Mieszaninę 1 zaznaczono linią ciągłą, podczas gdy chromatogram mieszaniny 2 – linią przerywaną.

Objętość retencji jest to objętość fazy ruchomej, która musi przepłynąć przez kolumnę od momentu wprowadzenia substancji, aż do momentu ukazania się maksimum pików w detektorze. Jeszcze inną wielkością, którą wykorzystuje się w HPLC jest tzw. czas retencji t_R , czyli czas, jaki upłynął od chwili wprowadzenia substancji do kolumny do momentu ukazania się maksimum pików w detektorze. Strzałki na powyższym rysunku pokazują czasy retencji dla mieszaniny trzech substancji A, B i C. Gdyby badać układ składający się z tych samych związków A, B, C, ale o innym stężeniu (linia przerywana), to wartości V_R i t_R byłyby takie same, ale powierzchnie pod pikami – inne. W mieszaninach M_1 i M_2 stężenie substancji A jest jednakowe, substancji B jest więcej w mieszaninie 2, zaś substancji C w tej mieszaninie jest prawi czterokrotnie mniej. A zatem można wyciągnąć wniosek, że powierzchnia pod pikiem, lub jego wysokość, jest proporcjonalna do stężenia badanej substancji. W konsekwencji metoda HPLC może być wykorzystywana, nie tylko do określania czystości substancji farmaceutycznych, ale również do ilościowej analizy ich rozpuszczalności.⁷⁴

Chromatografia cieczowa jest jedną z najszybciej rozwijających się technik w analizie instrumentalnej. Wprowadzenie nowoczesnych rozwiązań, takich jak zastosowanie cząstek wypełniających kolumny o wielkości 1–2 μm oraz konstrukcja chromatografów zdolnych pracować przy ciśnieniu znacznie wyższym niż w przypadku tradycyjnego HPLC doprowadziło do powstania szybkiej chromatografii cieczowej – UPLC (ang. *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Wyniki analiz chromatograficznych przedstawione w niniejszej pracy wykonane zostały, na takim właśnie urządzeniu, w Zakładach Farmaceutycznych „Polpharma S.A”.

3 CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW

Aktualnie znanych i stosowanych jest wiele doustnych leków przeciwcukrzycowych. Preparaty te, charakteryzujące się zróżnicowanym mechanizmem działania, można podzielić na 5 grup Są to: pochodne sulfonylomocznika, glinidy, biguanidy, tiazolidinediony oraz inhibitory α -glukozydazy (Tabela 3.1).⁷⁵

Tabela 3.1 Charakterystyka leków stosowanych w terapii doustnej w cukrzycy typu 2.⁷⁵

Parametr	Pochodne sulfonylo-mocznika	Pochodne metglinidu	Pochodne biguanidu	Tiazo-lidinediony	Inhibitory α -glukozydazy
Mechanizm działania	↑ wydzielania insuliny	↑ wydzielania insuliny	↑ obwodowego zużycia glukozy ↓ wątrobowej produkcji glukozy	↑↑ obwodowego zużycia glukozy ↓ wątrobowej produkcji glukozy	↓ jelitowego wchłaniania glukozy
Miejsce działania	trzustka	trzustka	wątroba, mięśnie	wątroba, tkanka tłuszczowa, mięśnie	jelito
Objawy niepożądane	hipoglikemia	hipoglikemia	żołądkowo-jelitowe	obrzęki, niedokrwistość	nadmierna ilość gazów, biegunka

Jednak farmaceutykami najczęściej stosowanymi w leczeniu cukrzycy typu 2 są pochodne sulfonylomocznika (PSM). Wywodzą się one z odkrytych w latach 30-tych XX wieku leków przeciwbakteryjnych - sulfonamidów. Ich działanie hipoglikemizujące zaobserwowano niespełna 15 lat później, natomiast pierwsze leki z tej grupy, tolbutamid i korbutamid, pojawiły się dopiero w końcówce lat 50-tych. Z kolei na wyjaśnienie mechanizmu działania PSM trzeba było poczekać kolejne 30 lat. Wtedy też nastąpił gwałtowny rozwój farmakologii cukrzycy. Od tamtej pory na rynku farmaceutycznym pojawiło się wiele leków przeciwcukrzycowych opartych na sulfonylomoczniku. Różnią się one między sobą czasem i siłą działania, a także ryzykiem wywołania hipoglikemii. W zależności od tego, z jaką siłą wpływają one na insulinooporność tkanek oraz sekrecję insuliny podzielono je na trzy generacje. Pierwsza z nich, do której należy m.in. tolbutamid czy chlorpropamid, została prawie całkowicie wyparta przez nowocześniejsze pochodne, należące do drugiej generacji

PSM - znacznie bezpieczniejsze i obarczone mniejszą liczbą działań niepożądanych. Preparaty zaliczane do tej grupy, takie jak gliklazyd, glikwidon czy glibenklamid, stosowane są do dziś w leczeniu cukrzycy typu 2 na całym świecie. Trzecia generacja PSM (np. glimepiryd) obdarzona jest natomiast dodatkowymi właściwościami. Mają one tzw. działanie pozatrzustkowe, czyli nie tylko pobudzają trzustkę do wydzielania insuliny, ale również poprawiają wykorzystanie insuliny przez inne tkanki (Tabela 3.2).⁷⁶

Tabela 3.2 Wpływ doustnych leków przeciwcukrzycowych opartych na sulfonilomoczniku na insulinoporność i insulinemię

PSM	Wpływ na insulinoporność	Wpływ na sekrecję insuliny
I i II generacji	0/+	+ + + +
III generacji	+ +	+ + +

Jako materiał badawczy w niniejszej pracy wybrano cztery przeciwcukrzycowe substancje lecznicze, których rdzeniem jest ugrupowanie sulfonilomocznikowe. Są to:

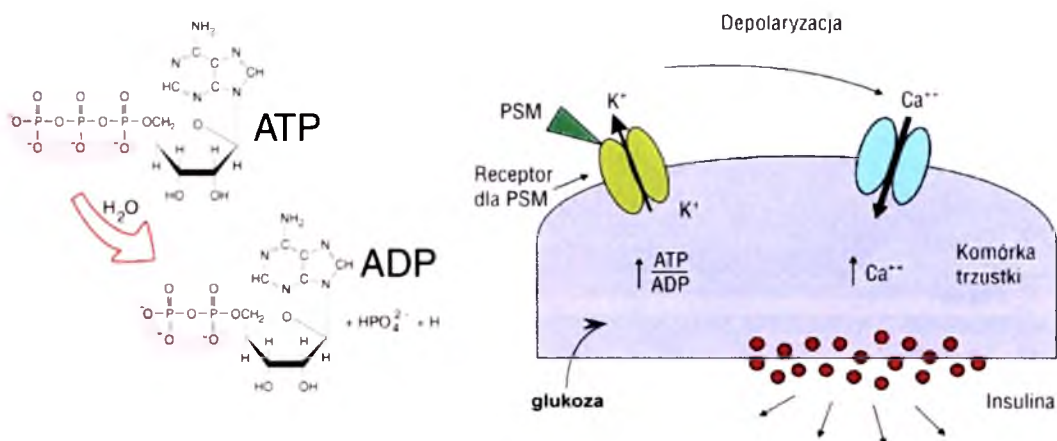
- chlorpropamid (lek I generacji),
- glibenklamid oraz gliklazyd (leki II generacji),
- glimepiryd (lek III generacji)

Zgodnie z systemem klasyfikacji biofarmaceutycznej (ang. *Biopharmaceutics Classification System, BCS*)⁷⁷, charakteryzującym leki pod względem ich rozpuszczalności w wodzie oraz przenikalności przez bariery biologiczne, wszystkie wymienione powyżej lekarstwa przeciwcukrzycowe PSM należą do II grupy BCS, co oznacza, że bardzo łatwo przenikają przez bariery biologiczne, ale ich dostępność biologiczna jest limitowana przez słabą rozpuszczalność. Stąd też badania nad zwiększeniem rozpuszczalności wymienionych leków przedstawione w niniejszej pracy.

3.1 Mechanizm działania leków opartych na PSM

Mechanizm działania sulfonilomocznikowych leków przeciwcukrzycowych polega na zwiększeniu sekrecji insuliny przez komórki β trzustki, a także w niewielkim stopniu na poprawie insulinowrażliwości tkanek. Mimo, iż efekty działania PSM na trzustkę zidentyfikowano już w latach 40-tych XX wieku, przez długi czas mechanizmy komórkowe kierujące tym procesem pozostawały nieznane. Dopiero w 1985 roku wykazano, że działanie PSM wiąże się z wpływem tych leków na kanały potasowe zależne od adenozyno-5'-trifosforanu, powszechnie znanego jako ATP.⁷⁶

W zdrowym organizmie wzrost stężenia glukozy w surowicy powoduje jej napływ do wnętrza komórek trzustki. Tam, w wyniku szeregu procesów komórkowych glukoza zamieniana jest na cząsteczki ATP, będące nośnikiem energii chemicznej w komórce. W efekcie wzrostu stężenia ATP, dochodzi do zamknięcia kanałów potasowych ATP-zależnych, a w konsekwencji do zatrzymania jonów potasowych w komórkach oraz depolaryzacji błony komórkowej. Prowadzi to następnie do otwarcia kanałów wapniowych, przez które jony Ca^{2+} napływają do wnętrza komórki. Są one niezbędne do aktywacji białka (tzw. kalmoduliny), które przyłączając 4 kationy wapnia zmienia swoją konformację, tworząc kompleks, który stymuluje trzustkę do wydzielania insuliny nagromadzonej w ziarnistościach komórkowych. W sytuacji, gdy komórki trzustki nie reagują wydzielaniem insuliny na rosnący poziom glukozy pojawia się konieczność stosowania doustnych farmaceutyków. Pochodne sulfonilomocznika wiążą się ze specyficznym receptorem w komórkach β trzustki, określanym jako SUR (ang. *sulphonylurea receptor*) i w ten sposób bezpośrednio wpływają na zamknięcie kanałów potasowych K_{ATP} . W efekcie uruchamia się opisany powyżej szereg mechanizmów prowadzący do wydzielania insuliny (Rys. 3.1).⁷⁵



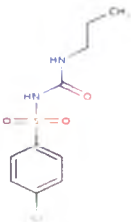
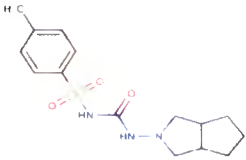
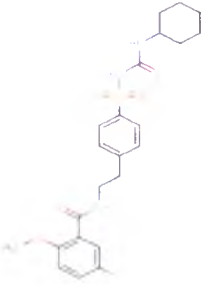
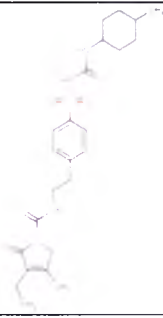
Rys. 3.1 Mechanizm działania pochodnych sulfonilomocznika (PSM) na komórki β trzustki. Dodatkowo przedstawione zostały wzory strukturalne cząsteczek ATP i ADP.

Ponieważ głównym zadaniem leków sulfonilomocznikowych jest stymulowanie komórek trzustki do zwiększonej sekrecji insuliny, preparaty, których mechanizm działania przedstawiony został powyżej, mogą być przyjmowane jedynie przez osoby z zachowaną czynnością wewnątrzwydzielniczą trzustki.

3.2 Charakterystyka fizykochemiczna badanych leków

Własności fizykochemiczne wraz ze wzorami strukturalnymi badanych substancji przedstawione zostały w tabeli 3.3. W tym miejscu warto wspomnieć, że obecność grupy sulfonilomocznikowej wszystkich przedstawionych leków warunkuje ich działanie hipoglikemizujące, natomiast budowa łańcuchów bocznych decyduje o sile, czasie działania i wiązania się z określonym podtypem receptora dla pochodnych sulfonilomocznika. Ma ona również wpływ na ewentualne pozatrzustkowe działania poszczególnych preparatów.

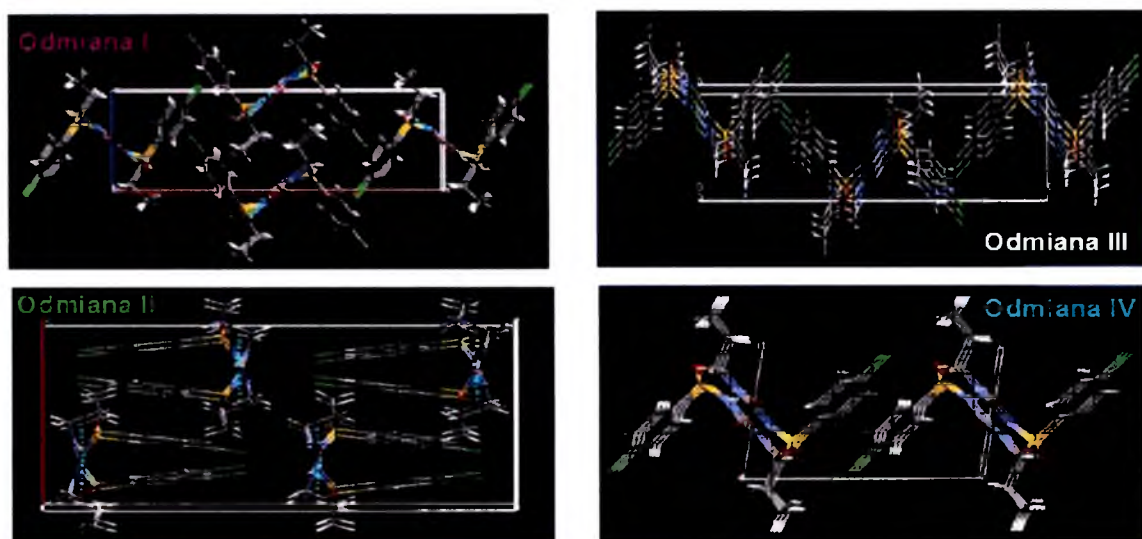
Tabela 3.3 Własności fizyczno-chemiczne badanych leków przeciwcukrzycowych.

PSM	Chlorpropamid (CHL)	Gliklazyd (GCL)	Glivenklamid (GCM)	Glimepiryd (GMP)
Wzór strukturalny				
Wzór sumaryczny	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S
Masa molekularna M _w [g/mol]	276.74	323.411	494.004	490.616
Temperatura topnienia T _m [K]	400-402	439	440-442	483
Dawka leku [mg]	100, 250	30, 60, 80	2.5, 5	1, 3

Krystaliczne formy przeciwcukrzycowych farmaceutyków badanych w niniejszej pracy zakupione zostały w firmie Sigma-Aldrich. Czystość wszystkich preparatów określona została przez producenta jako przewyższająca 99%.

4 BADANIA LEKU PRZECIWCUKRZYCOWEGO I GENERACJI – CHLORPROPAMIDU (CHL)

Badania sulfonilomocznikowych leków przeciwcukrzycowych rozpoczęto od chlorpropamidu (CHL), jednego z pierwszych PSM wprowadzonych na rynek. Substancja ta przez wiele lat wykorzystywana była w leczeniu cukrzycy typu 2, jednak ze względu na dużą ilość skutków ubocznych jakie wywołuje coraz częściej zastępowana jest lekami II i III generacji. Znacząca ilość działań niepożądanych CHL wynika najprawdopodobniej z dużych dawek substancji czynnej w jednej tabletkce – nawet 250 mg, co jest konieczne z uwagi na niewielką rozpuszczalność CHL (157 µg/ml). A zatem znalezienie metody pozwalającej na zmniejszenie dawki leku, przy zachowaniu optimum działania terapeutycznego, może zdecydowanie wpłynąć na poprawę bezpieczeństwa jego stosowania. Jak pokazują dane literaturowe, w tym celu próbowano wykorzystać fakt, iż CHL może występować w postaci czterech odmian polimorficznych (I, II, III, IV) tj. układów mających taki sam skład chemiczny, ale różniących się typem sieci krystalicznej oraz parametrami charakteryzującymi komórkę elementarną (Rys. 4.1).^{78,79}



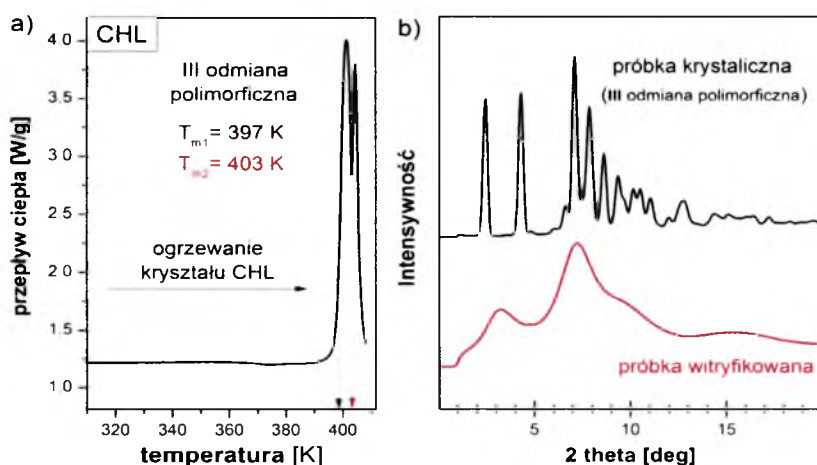
Rys. 4.1 Wizualizacja konformacji molekul CHL w jego różnych odmianach polimorficznych. Rysunek zaczerpnięto z pracy [80].

Oczekiwano, że różniące się temperaturą topnienia odmiany polimorficzne CHL, powinny wykazywać również odmienną rozpuszczalność oraz szybkość rozpuszczania. Wynika to z założenia, iż odmiana polimorficzna charakteryzująca się najniższą temperaturą topnienia najłatwiej uwolni cząsteczki z sieci krystalicznej. W konsekwencji „słaba” sieć

krystaliczna będzie charakteryzowała się wysokim wskaźnikiem rozpuszczalności. Badania rozpuszczalności oraz szybkości rozpuszczania wszystkich form polimorficznych CHL potwierdziły powyższą tezę. Jednak II forma leku, charakteryzująca się najniższą wartością T_m (368 K), okazała się być termodynamicznie nietrwała. Podczas przechowywania bardzo łatwo ulega transformacji do stabilnej, komercyjnej formy III. Z kolei pozostałe dwa „polimorfy” I i IV, o wartościach temperatur topnienia zbliżonych do odmiany III, charakteryzuje również podobna do niej rozpuszczalność. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki zasadne wydają się być poszukiwania innej drogi poprawy rozpuszczalności CHL, która umożliwi stosowanie mniejszych dawek leku.⁸¹ Z uwagi na dużą ilość danych eksperymentalnych pokazujących, iż znaczną poprawę rozpuszczalności substancji leczniczej można uzyskać w wyniku przeprowadzenia jej z postaci krystalicznej w amorficzną, wykorzystując technikę izobarycznego schładzania cieczy, podjęto próbę otrzymania amorficznej postaci CHL. Niniejszy rozdział przedstawia wyniki badań chemicznej i fizycznej stabilności otrzymanej substancji oraz ich dyskusję w oparciu o badania dynamiki molekularnej.

4.1 Badania chemicznej stabilności amorficznej formy CHL

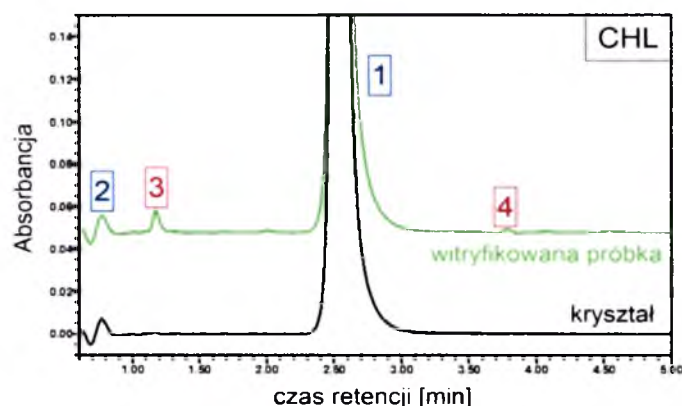
Badania CHL rozpoczęto od zidentyfikowania odmiany polimorficznej zakupionej próbki badanego leku. Z uwagi na to, iż poszczególne formy krystaliczne różnią się między sobą temperaturą topnienia, zadanie to można łatwo zrealizować przy użyciu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Krystaliczną formę CHL ogrzewano w aparacie DSC od temperatury nieco przewyższającej pokojową aż do 410 K. Otrzymany termogram przedstawiony został na rys. 4.2a.



Rys. 4.2 (a) Termogram otrzymany podczas ogrzewania krystalicznej formy leku. (b) Dyfraktogram rentgenowski krystalicznej i amorficznej próbki CHL.

Jak łatwo zauważyć, w zakresie temperatur 397 – 407 K pojawiają się dwa endotermiczne piki, co oznacza, że badana próbka topi się dwuetapowo. A zatem mogłoby się wydawać, że jest ona mieszaniną dwóch odmian polimorficznych. Bazując na przedstawionych danych kalorymetrycznych oraz ich literaturowej interpretacji możemy wnioskować, iż wyjściowym materiałem krystalicznym jest jednak jedna III (komercyjna) odmiana polimorficzna CHL.⁸² Aby potwierdzić to stwierdzenie wykonano pomiary z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej, które również porównano z danymi opublikowanymi w literaturze. Otrzymany wynik, przedstawiony na rys. 4.2b, jednoznacznie potwierdza iż mamy do czynienia z III odmianą polimorficzną CHL. Kolejny etap badań, polegający na szybkim przechłodzeniu uprzednio stopionego CHL okazał się skuteczną metodą jego amorfizacji. Szerokie „halo” amorficzne przedstawione na rys. 4.2b jest na to jednoznacznym dowodem.

Z uwagi na to, iż czystość chemiczna leku jest warunkiem koniecznym do jego komercjalizacji wykorzystując technikę ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC) wykonano również badania chemicznej stabilności amorficznej formy CHL. Pomiary przeprowadzono w Zakładach Farmaceutycznych „Polpharma S.A”. Chromatogram witryfikowanej próbki leku, porównany z danymi uzyskanymi dla formy krystalicznej, przedstawia rys. 4.3.



Rys. 4.3 Chromatogram próbek CHL krystalicznej (czarna linia) oraz otrzymanej metodą witryfikacji (zielona linia). Pik nr 2 na chromatogramie pochodzi od rozpuszczalnika użytego do przygotowania próbek (metanol:woda).

Jak widać na powyższym rysunku chromatogram krystalicznej formy CHL (czarna linia) składa się z dwóch pików, o czasach retencji odpowiednio 0.46 i 2.55 min. Podczas, gdy pierwszy z nich świadczy o obecności rozpuszczalnika użytego do przygotowania roztworu (metanol : woda w stosunku objętościowym 1:1) drugi, o zdecydowanie większej intensywności, jest charakterystyczny dla badanego leku. Z kolei w przypadku witryfikowanej próbki CHL obserwujemy dodatkowe dwa piki, oznaczone numerami 3 i 4,

mogące świadczyć o zanieczyszczeniach powstałych w procesie witrifikacji leku. Jednak biorąc pod uwagę ich ilość, równą zaledwie 0.62 %, możemy przyjąć, że amorficzna próbka CHL charakteryzuje się czystością spełniającą rygorystyczne wymogi farmaceutów (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Ilościowa interpretacja chromatogramów UPLC badanych próbek CHL.

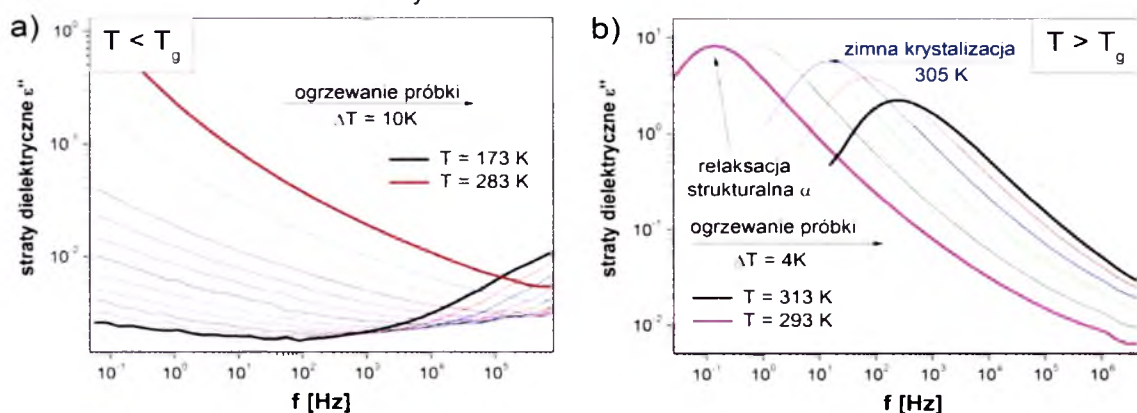
Nr piku retencji	Czas retencji [min]	Powierzchnia pików [%]	
		Kryształ GCL	Szkło GCL
2	0.46	rozpuszczalnik	
3	1.10	-	0.51
1	2.55	100	99.38
4	3.70	-	0.11

4.2 Dynamika molekularna CHL w warunkach ciśnienia atmosferycznego

W ostatnich latach coraz częściej tradycyjny opis własności fizykochemicznych amorficznych substancji farmaceutycznych, obejmujący badania z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej czy technik spektroskopowych typu FT-IR, poszerza się o analizę ruchów relaksacyjnych molekuł w bardzo szerokim zakresie częstotliwości przy użyciu szerokopasmowej spektroskopii dielektrycznej. Tego typu badania są niezwykle istotne, gdyż umożliwiają nie tylko oszacowanie temperatury przejścia szklanego badanego materiału leczniczego, ale także rozeznanie jego stabilności fizycznej w zmieniających się warunkach termodynamicznych.

W celu opisanie dynamiki molekularnej chlorpropamidu, stosując technikę izobarycznego schładzania stopionej w atmosferze powietrza substancji, przygotowano amorficzną próbkę leku, którą następnie umieszczono w spektrometrze dielektrycznym. Widma strat dielektrycznych $\epsilon''(f)$, zarejestrowane podczas ogrzewania CHL w zakresie temperatur 173 – 313 K przedstawia rys. 4.4.

Dynamika molekularna CHL



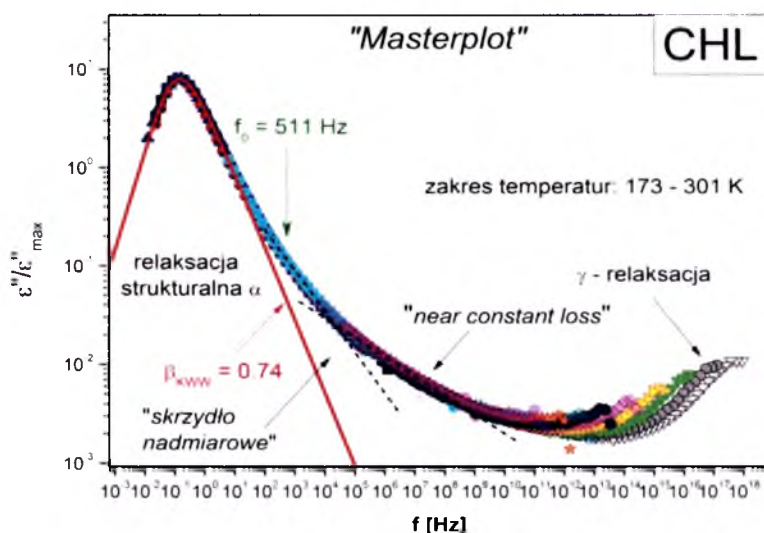
Rys. 4.4 Widma strat dielektrycznych CHL zarejestrowane zarówno poniżej (a) jak i powyżej (b) temperatury zeszklenia.

Jak pokazuje rys. 4.4a, krzywe absorpcji zarejestrowane w bardzo niskich temperaturach, rzędu 173 K, w rejonie wysokich częstotliwości ujawniają obecność drugorzędowego procesu relaksacyjnego. Niestety, z uwagi na fakt, iż jest on bardzo słabo widoczny w oknie pomiarowym, nie jesteśmy w stanie przeprowadzić żadnej jego charakterystyki. Ze wzrostem temperatury obserwujemy natomiast powolny, monotoniczny wzrost nachylenia krzywych strat dielektrycznych, które w obszarze temperatur 183 - 213 zostało oszacowane na 0.18. Zgodnie z danymi literaturowymi obserwowane zjawisko nazywane jest „*near constant loss*” (NCL).^{83,84} Aby zinterpretować mechanizm molekularny tego procesu należy krótko przypomnieć pochodzenie drugorzędowych procesów relaksacyjnych. Otóż, ich źródłem może być zarówno wewnątrzcząsteczkowy ruch drobnego fragmentu molekuly jak i niewielkie rotacyjne i translacyjne ruchy cząsteczki uwięzionej w klatce utworzonej przez sąsiednie molekuly tzw. „*cage dynamics*”. W sytuacji, gdy pojedyncze cząsteczki opuszczają wspomnianą klatkę obserwujemy zjawisko NCL. W tym miejscu warto nadmienić, iż dynamika NCL ma charakter uniwersalny. Jednak w przypadku cieczy dipolowych jest bardzo rzadko obserwowana eksperymentalnie. Dzieje się tak, ponieważ z reguły, w obszarze w jakim pojawia się NCL występują relaksacje II rzędu, które go zasłaniają.⁸⁵

W wyniku dalszego ogrzewania próbki CHL nachylenie krzywych $\epsilon''(f)$ nieco się zmienia, po czym w temperaturze 293 K, w oknie pomiarowym, pojawia się proces relaksacji strukturalnej α . Z uwagi na fakt, iż w monitorowanym obszarze cieczy przechłodzonej CHL krzywe strat dielektrycznych charakteryzuje znaczący wkład przewodnictwa stałoprądowego σ , utrudniający dokładną identyfikację maksimum procesu α , przy pomocy programu WinFIT firmy Novocontrol wpływ σ odjęto od całkowitego widma $\epsilon''(f)$. Efekt tej procedury

przedstawiony został na rys. 4.4b. Jak łatwo zauważyć, ogrzewaniu próbki towarzyszy zmiana położenia procesu relaksacji α w stronę wysokich częstotliwości, co świadczy o malejącej lepkości CHL. Ponadto w temperaturze równej 305 K obserwujemy wyraźny spadek intensywności krzywej absorpcji, wynikający z rosnącej ilości regionów krystalicznych, które nie dają wkładu do dielektrycznej odpowiedzi układu związanej z dipolową reorientacją. Jest to tzw. zjawisko „zimnej krystalizacji”.⁸⁶

Aby przedstawić ewolucję czasową dynamiki molekularnej badanego leku na jednym wykresie, widma strat dielektrycznych zmierzone w całym dostępnym zakresie temperatur zostały przesunięte horyzontalnie na krzywą zarejestrowaną w $T = 293$ K, tj. w pobliżu temperatury zeszklenia próbki. Jedynym założeniem jakie poczyniono jest niezmienność wysokości pików relaksacji strukturalnej zarówno w obszarze cieczy przechłodzonej CHL jak i rejonie obejmującym fazę szklaną. Wynik zastosowanej procedury, czyli tzw. „masterplot”, przedstawia rys. 4.5.



Rys. 4.5 „Masterplot” złożony z widm strat dielektrycznych CHL zarejestrowanych w ciśnieniu atmosferycznym zarówno powyżej jak i poniżej T_g . Zielona strzałka wskazuje pozycję maksimum pików ukrytej relaksacji JG wyznaczoną na podstawie modelu sprzężeniowego.

Na podstawie otrzymanego rysunku można wyciągnąć kilka wniosków. Po pierwsze, wyraźnie widać, iż kształt procesu relaksacji strukturalnej odzwierciedlającej kooperatywny ruch molekuł CHL, jest niezależny od temperatury. Ponadto jest on szerszy w stosunku do klasycznego modelu Debye’a. Aby dokładnie scharakteryzować kształt krzywej $\epsilon''(f)$ wykonano aproksymację danych eksperymentalnych równaniem KWW (równ. 2.16). Otrzymany wynik dopasowania funkcją o parametrze $\beta_{KWW} = 0.74$ przedstawia rys. 4.5.

W tym miejscu warto nadmienić, że wiedza na temat dystrybucji molekularnych czasów relaksacji układu amorficznego, odzwierciedlana w szerokości procesu relaksacji strukturalnej, odgrywa znaczącą rolę w przewidywaniu tendencji układu do rekrytalizacji. Niespełna 10 lat temu Shamblin zasugerował, że stabilność fizyczna amorficznych substancji leczniczych powinna rosnać wraz ze zwiężaniem piku relaksacji strukturalnej, tj. ze wzrostem parametru β_{KWW} ⁸⁷. Zgodnie z tą sugestią, amorficzny CHL, charakteryzujący się jedną z wyższych wartości parametru poszerzenia eksponencjalnego, jakie otrzymano do tej pory dla substancji farmaceutycznych (Tabela 4.2), powinien charakteryzować się niewielką tendencją do rekrytalizacji.

Tabela 4.2 Wartości parametru poszerzenia eksponencjalnego β_{KWW} dla różnych amorficznych farmaceutyków.

Substancja aktywna	β_{KWW}
Celecoxib ⁴	0.67
Indometacyna ³²	0.59
Indapamid	0.72
Glimepiryd	0.60
Chlorpropamid	0.74
Acetaminoprofen	0.79
Ibuprofen ³³	0.55
Glibenklamid ³⁵	0.74
Nonivamid ³¹	0.79
Telmisartan ³⁴	0.61
Sildenafil	0.68

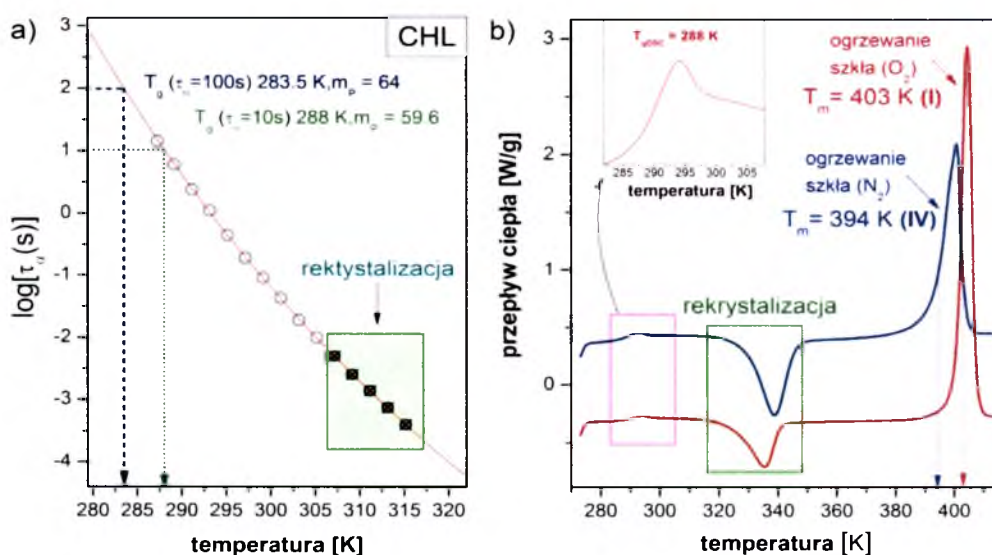
Jednak wyniki eksperymentów przedstawionych we wcześniejszej części pracy pokazują całkowicie odmienną tendencję tj. znaczną niestabilność fizyczną badanego układu. A zatem w przypadku chlorpropamidu teoria Shamblina nie zyskuje potwierdzenia.

Kontynuując analizę danych przedstawionych na rys. 4.5 warto zwrócić uwagę na fakt, iż funkcja KWW dobrze opisuje punkty eksperymentalne jedynie w zakresie obejmującym maksimum piku relaksacji α . Z kolei w obszarze dwóch dekad powyżej częstotliwości f_{max} obserwujemy odejście krzywej KWW od danych $\epsilon''(f)$. Zjawisko to, zwane „skrzydłem nadmiarowym” (ang. *excess wing*, EW) często interpretowane jest jako ukryty II-rzędowy proces relaksacyjny typu Johari-Goldstein.⁴⁹ Zgodnie z tym założeniem EW stanowi wysokoczęstotliwościowe zbocze relaksacji JG, której maksimum leży na tyle blisko procesu α , że jego obserwacja nie jest możliwa. Jedną z metod pozwalających zweryfikować ten pogląd jest zastosowanie modelu sprzężeniowego (równ. 1.6), który umożliwia wyznaczenie najbardziej prawdopodobnej częstotliwości maksimum relaksacji JG, f_0 .

Wykorzystując wyznaczoną wcześniej wartość parametru $\beta_{\text{KWW}} = 0.74$, oraz τ_α procesu zarejestrowanego w temperaturze 293 K oszacowano położenie czasu relaksacji prymitywnej. Odpowiadająca mu częstotliwość $f_0 = 511$ Hz, wskazuje na obszar, w którym widoczny jest EW (zielona strzałka na rys 4.5). A zatem możemy wnioskować, iż amorficzną postać chlorpropamidu charakteryzuje obecność β - relaksacji, będącej odzwierciedleniem niewielkich ruchów całych molekuł badanego leku, będących prekursorem relaksacji strukturalnej.

Idąc dalej drogą punktów eksperymentalnych przedstawionych na rys. 4.5, możemy wyrazić zauważyć, iż nachylenie krzywych $\epsilon''(f)$ charakterystyczne dla EW zdecydowanie maleje. Jak już wspomniano wcześniej, jest to tzw. obszar reżimu „near constant loss”, charakterystyczny dla wszystkich cieczy tworzących szkliwa, jednak bardzo rzadko obserwowany eksperymentalnie. W przypadku chlorpropamidu ujawnienie procesu NCL było możliwe dzięki bardzo dużej separacji relaksacji γ , ledwo widocznej w obszarze wysokich częstotliwości, od procesu α .

W kolejnym etapie analizy dynamiki molekularnej badanego leku przeciwcukrzycowego, korzystając z relacji wiążącej czas relaksacji τ oraz częstotliwość położenia maksimum strat dielektrycznych f_{max} , $\tau = 1/2\pi f_{\text{max}}$, wyznaczono temperaturowe zależności czasów relaksacji strukturalnej CHL. Otrzymany wynik przedstawiony został na rys. 4.6a.

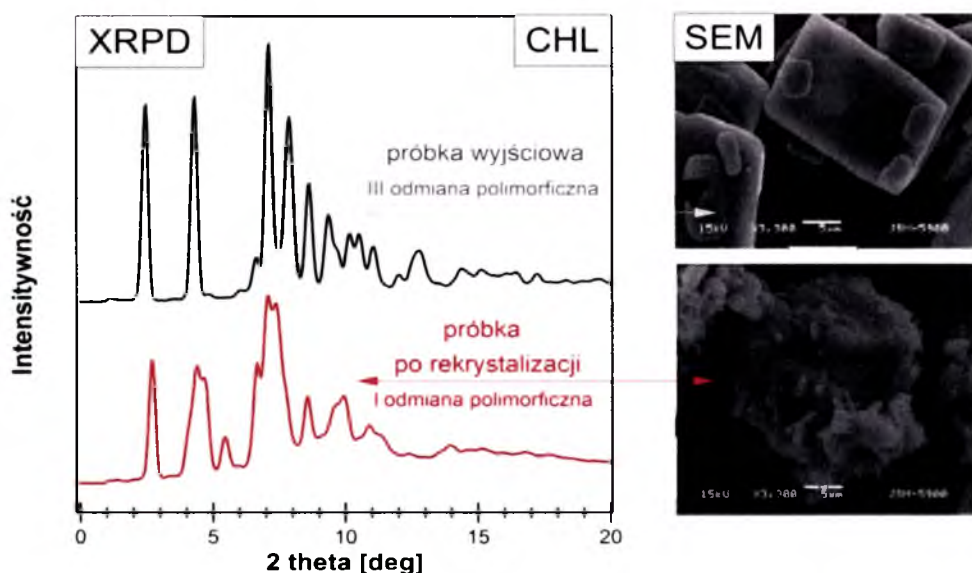


Rys. 4.6 Panel (a) przedstawia temperaturową zależność czasów relaksacji strukturalnej CHL. Panel (b) przedstawia termogramy CHL otrzymane podczas ogrzewania amorficznej próbki w atmosferze powietrza (czerwona linia) oraz azotu (niebieska linia). Na zielono zaznaczono obszary, w którym odbywa się rekrytalizacja amorficznej próbki.

Z uwagi na fakt, iż zależność $\log\tau_\alpha(T)$ wykazuje lekko niearrheniusowski charakter można ją opisać równaniem VFT (równ. 1.1). Najlepszy wynik dopasowania funkcji do punktów eksperymentalnych uzyskano dla następującego zestawu parametrów: $\log\tau_\infty = -18.8 \pm 1.1$, $D_T = 25.86 \pm 4.04$, $T_0 = 187 \pm 7$ K. Korzystając z ekstrapolacji funkcji VFT do wartości $\log\tau_\alpha = 2$ możemy wyznaczyć parametry charakteryzujące dynamikę molekularną badanego leku, tj. temperaturę przejścia szklanego T_g dla $\tau_\alpha = 100$ s oraz kruchość izobaryczną m_P (równ. 1.2). Oszacowana temperatura przejścia ciecz – szkło dla CHL wynosi 283.5 K i jest o 5 K niższa od wyniku otrzymanego metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej (wstawka do rys. 4.6b). Otrzymana różnica wynika najprawdopodobniej z odmiennego tempa ogrzewania próbki w obydwu metodach. W tym miejscu warto również dodać, iż definicja przejścia szklanego jest „płynna”. Najczęściej stosuje się taką mówiącą, że $T_g = T(\tau_\alpha = 100$ s) jednak inne np. $T_g = T(\tau_\alpha = 10$ s) są również dopuszczalne. W przypadku zastosowania drugiego z wymienionych podejść, podczas analizy danych CHL, uzyskano idealną zgodność $T_{gBDS} = T_{gDSC}$. Jednak mimo to do dalszych analiz wykorzystana zostanie wartość $T_g = 283.5$ K.

Ponieważ kolejną cechą charakterystyczną cieczy tworzących szkliva jest odchylenie krzywej $\log\tau_\alpha(T)$ od przebiegu liniowego stosując równ. 1.2 oszacowano wartość kruchości izobarycznej m_P , będącej miarą niearrheniusowskiego zachowania temperaturowych zależności czasów relaksacji badanej substancji. Wynosi ona 64. A zatem zgodnie z przyjętym podziałem na substancje silne ($m_P \leq 30$) oraz kruche ($m_P \geq 100$) CHL można zaliczyć do cieczy o średniej kruchości. W tym miejscu warto wspomnieć, iż m_P jest jednym z parametrów, które mogą posłużyć do określania tendencji układu amorficznego do rekrytalizacji. Teoretycznego opisu wiążącego wartość kruchości ze stabilnością fazy amorficznej dostarcza TOP (ang. *two order parameter*) model zaproponowany przez H. Tanaka.⁸⁸ Oparty jest on na koncepcji współzawodnictwa między uporządkowaniem dalekiego oraz bliskiego zasięgu badanej próbki. W sytuacji, gdy dominuje drugi z wymienionych efektów układ charakteryzuje się stabilnością w fazie amorficznej oraz niską wartością kruchości. A zatem zgodnie z powyższymi założeniami modelu TOP chlorpropamid powinien charakteryzować się w miarę dobrą stabilnością fizyczną. Jednak jak już wspomniano wcześniej witrifikowana próbka CHL bardzo łatwo powraca do stabilnej formy krystalicznej. Z uwagi na fakt, iż badana substancja może występować w postaci kilku krystalicznych odmian polimorficznych ciekawe wydaje się określenie do jakiej formy odbywa się rekrytalizacja amorficznej próbki CHL. Aby dostarczyć szczegółowych informacji na ten temat wykonano pomiary DSC witrifikowanej próbki CHL. Szklistą formę

leku ogrzano w aparacie DSC powyżej temperatury przejścia szkło - ciecz. Egzotermiczny pik widoczny na rys. 4.6b, w zakresie temperatur 320 – 348 K, świadczący o rekrytalizacji układu, potwierdza wcześniejsze sugestie odnośnie niestabilności CHL. Co ciekawe, okazuje się, że topienie odbywa się jednoetapowo, ponadto temperatura topnienia otrzymanego kryształu różni się od wartości charakteryzującej komercyjną, III odmianę polimorficzną CHL, tj. strukturę obecną w materiale wyjściowym. Wynosi ona 403 K. Otrzymany wynik sugeruje, że próbka stopiona a następnie przechłodzona w warunkach dostępu powietrza rekrytalizuje do innej niż wyjściowa odmiany polimorficznej. Przypuszczenie to zostało potwierdzone badaniami dyfrakcji rentgenowskiej. Jak pokazuje rys. 4.7 próbki startową oraz otrzymaną w wyniku rekrytalizacji materiału amorficznego charakteryzują inne refleksy Bragga. Na podstawie porównania przedstawionych danych eksperymentalnych XRD oraz DSC z danymi literaturowymi określono, iż nowopowstały kryształ to I odmiana polimorficzna CHL.



Rys. 4.7 Dyfraktogramy rentgenowskie krystalicznych próbek CHL, wyjściowej oraz otrzymanej po rekrytalizacji. Prawy panel przedstawia obrazy odmian polimorficznych CHL I i III zarejestrowane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Dane ze skaningowego mikroskopu elektronowego zaczerpnięto z pracy [89].

W kontekście otrzymanego wyniku interesującymi wydają się badania dewitryfikacji próbki przygotowanej w atmosferze beztlenowej. W tym celu proces topienia oraz izobarycznego schładzania cieczy CHL przeprowadzono w aparacie DSC. Termogram powstały w wyniku ogrzewania tak przygotowanego materiału przedstawia niebieska linia na rys. 4.6b. Jak łatwo zauważyć w tym przypadku, podobnie jak w poprzednim, wzrost temperatury pociąga za sobą

rekrytalizację badanego materiału. Jednak w przeciwieństwie do amorficznej próbki otrzymanej w atmosferze powietrza w tym przypadku rekrytalizacja odbywa się do IV, a nie do I odmiany polimorficznej CHL.

Reasumując wyniki badań przedstawione w niniejszym rozdziale możemy powiedzieć, że witrifikacja jest skuteczną metodą przygotowania szklistej formy CHL. Jednak z uwagi na dużą niestabilność fizyczną próbki, nie jest dobry sposób otrzymywania leku charakteryzującego się lepszą rozpuszczalnością w porównaniu z postacią krystaliczną dostępną obecnie na rynku.

5 BADANIA LEKÓW PRZECIWCUKRZYCOWYCH II GENERACJI – GLIBENKLAMIDU (GCM) I GLIKLAZYDU (GCL)

Sulfonilomocznikowe leki przeciwcukrzycowe II generacji, do których należą m.in. glibenklamid oraz gliklazyd, to jedne z najczęściej stosowanych substancji leczniczych w farmakologii cukrzycy typu 2. Obecnie na światowym rynku farmaceutycznym dostępnych jest ponad 200 preparatów glibenklamidu oraz ponad 100 gliklazydu produkowanych m.in. przez największe światowe firmy farmaceutyczne takie jak Servier czy Merck. Warto nadmienić, iż w każdym przypadku substancja aktywna leku występuje w postaci krystalicznej. Tego typu układy są termodynamicznie stabilne, łatwo określić ich właściwości fizykochemiczne oraz najlepsze warunki przechowywania. Jednak liczne badania wykazały, że krystaliczne formy glibenklamidu i gliklazydu charakteryzują się słabą dostępnością biologiczną, wynoszącą odpowiednio 45% oraz 40%, limitowaną przez niską dostępnością farmaceutyczną, definiowaną jako ilość substancji leczniczej uwolnionej w warunkach *in vitro* z tabletki oraz szybkość, z jaką ten proces zachodzi. A zatem dostępność farmaceutyczna determinowana jest przez rozpuszczalność oraz szybkość rozpuszczania leku. Ponieważ najnowsze doniesienia naukowe pokazują, iż znaczną poprawę rozpuszczalności, a w konsekwencji dostępności farmaceutycznej i biodostępności substancji leczniczej można uzyskać w wyniku przeprowadzenia jej z postaci krystalicznej w amorficzną, podjęliśmy próby amorfizacji leków przeciwcukrzycowych II generacji, glibenklamidu i gliklazydu.

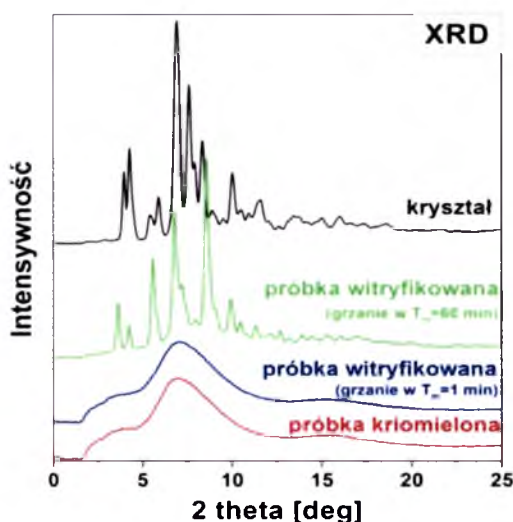
W rozdziale tym przedstawione zostaną badania dynamiki molekularnej oraz fizycznej i chemicznej stabilności amorficznych form leków PSM II generacji, otrzymanych technikami wityfikacji i mielenia kriogenicznego.

5.1 Chemiczna stabilność amorficznych form GCM – wityfikowanej i kriomielonej

Pierwsza próba amorfizacji glibenklamidu (GCM), metodą izobarycznego schładzania stopionej substancji, wykonana została ponad 20 lat temu przez badacza z Indii - M. Hassana.⁹⁰ Podobne badania wykonane zostały również w 2000 roku przez Greków A. Panagopoulou-Kapalani oraz S. Malamatarisa.⁹¹ W obydwu przypadkach otrzymano amorficzną formę glibenklamidu o zadowalającej czystości, pomimo faktu, iż próbka wygrzewana była w temperaturze przewyższającej temperaturę topnienia leku o 18 K (458

K). Jednak 5 lat później w czasopiśmie *J. Pharm. Sci.* pojawił się artykuł, którego autorzy zasugerowali znaczną termiczną degradację GCM podczas topienia krystalicznej substancji. Jednocześnie pokazali oni, że amorficzną, czystą próbkę GCM można otrzymać stosując mielenie kulowe w temperaturze pokojowej.⁹² Te sprzeczne doniesienia literaturowe skłoniły nas do wykonania dogłębnej analizy stabilności chemicznej witryfikowanej formy leku.

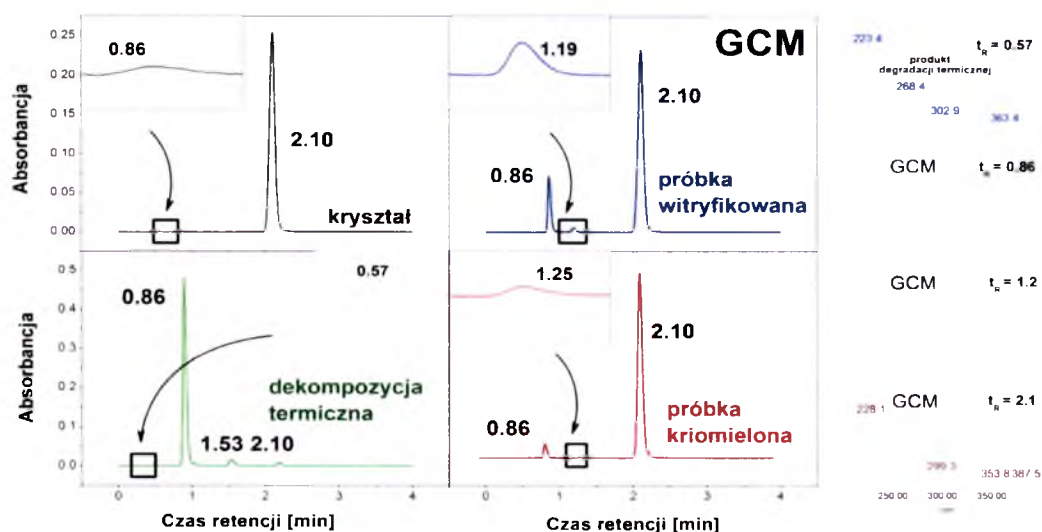
W pierwszej kolejności do badań przygotowano dwie próbki GCM różniące się między sobą czasem wygrzewania w temperaturze topnienia ($T_m=440$ K). Pierwsza z nich została przechłodzona za ledwie po minucie, z kolei druga dopiero po godzinie, ogrzewania w T_m . Już na pierwszy rzut oka obydwa materiały zdecydowanie różniły się między sobą. A mianowicie, substancja poddana długoterminowemu wygrzewaniu brązowieje i traci przezroczystość, podczas gdy druga jest bezbarwna i transparentna. Obydwie próbki zostały następnie poddane rentgenowskiej analizie strukturalnej. Brak wyraźnych refleksów dyfrakcyjnych pochodzących od poszczególnych płaszczyzn symetrii (niebieska linia na rys. 5.1) charakterystycznych dla kryształu GCM (czarna linia na rys. 5.1), świadczy o tym, iż próbka glibenklamidu otrzymana standardowo przeprowadzoną metodą izobarycznego schładzania stopionej substancji, jest w pełni amorficzna. Z kolei pojawienie się dużej ilości refleksów Bragga na dyfraktogramie materiału wygrzewanego w temperaturze topnienia przez godzinę (linia zielona na rys. 5.1) jest ewidentną oznaką jego krystalicznej struktury. Dodatkowo, warto zwrócić uwagę na to, iż linie dyfrakcyjne omawianej substancji nie pokrywają się refleksami pochodzącymi od krystalicznego materiału wyjściowego GCM, co może wstępnie świadczyć o rozkładzie termicznym badanej próbki.



Rys. 5.1 Dyfraktogram rentgenowski próbek: krystalicznej (czarna linia), wygrzewanej w T_m przez 60 minut a następnie szybko schłodzonej (zielona linia), wygrzewanej w T_m przez 1 minutę a następnie szybko schłodzonej (niebieska linia), otrzymanej w wyniku mielenia kriogenicznego (czerwona linia).

Ponieważ badania chromatograficzne są jednymi z najczęściej wykorzystywanych do analizy czystości substancji leczniczych, to właśnie technika ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) z detekcją UV została wykorzystana jako pierwsza do określenia chemicznej stabilności witryfikowanych próbek GCM. Badania wykonane zostały w Zakładach Farmaceutycznych „Polpharma”.

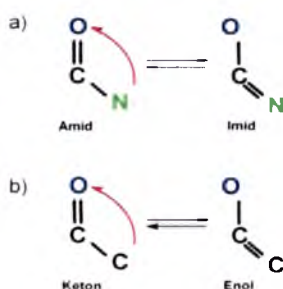
Analizie z wykorzystaniem techniki UPLC w pierwszej kolejności poddano referencyjną, krystaliczną próbkę glibenklamidu. Jak pokazuje rys. 5.2, chromatogram tej formy GCM składa się z dwóch pików, o czasach retencji odpowiednio 2.10 i 0.86 min. W następnej kolejności przebadano dwie próbki GCM poddane standardowej i niekonwencjonalnej witryfikacji. Jak łatwo zauważyć na rys. 5.2 w obydwu wymienionych przypadkach ilość pików wzrosła (linia niebieska i zielona). Podczas gdy chromatogram próbki otrzymanej na drodze standardowej witryfikacji, oprócz pików charakterystycznych dla formy krystalicznej zawiera jeden dodatkowy, o czasie retencji $t_R = 1.19$ min, wynik badania UPLC dla próbki wygrzewanej przez 60 min w T_m charakteryzuje się obecnością dwóch dodatkowych pików o $t_R = 0.57$ oraz 1.53 min. W tym miejscu warto zaznaczyć, iż jedynie piki o $t_R = 0.86$, 1.19 oraz 2.10 posiadają widmo UV charakterystyczne dla cząsteczki glibenklamidu (Rys. 5.2). A zatem piki o $t_R = 0.57$ oraz 1.53 świadczą w tym przypadku o obecności w wygrzewanym materiale dodatkowych substancji, będących najprawdopodobniej produktami rozkładu termicznego cząsteczki GCM.



Rys. 5.2 Chromatogramy UPLC próbek GCM: krystalicznej, witryfikowanej, mielonej w warunkach kriogenicznych oraz wygrzewanej w T_m przez godzinę. Ponadto przedstawiono widma UV odpowiadające poszczególnym pikom widocznym na chromatogramach.

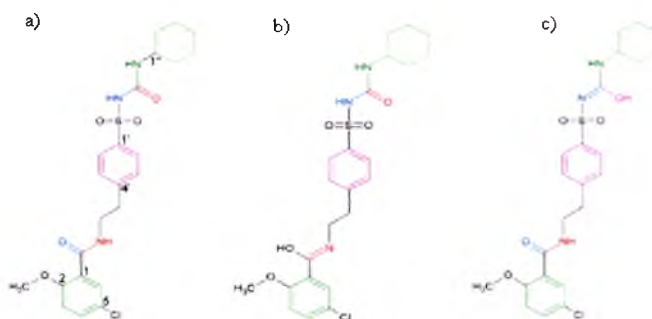
Aby upewnić się, że dodatkowe piki na chromatogramie próbki amorficznej otrzymanej metodą izobarycznego schładzania nie są efektem jej częściowej degradacji podjęto próbę amorfizacji glibenklamidu metodą mielenia kriogenicznego. Jak dotąd technika ta uważana jest za „najbezpieczniejszą” metodę otrzymania fazy szklistej, tj. nie powodującą degradacji mielonego materiału. W wyniku 3-godzinnego efektywnego mielenia wykonanego w 6-minutowych cyklach oddzielonych 3-minutowymi okresami ochładzającymi otrzymano próbkę GCM, której amorficzna natura potwierdzona została przez szerokie halo przedstawione na dyfraktogramie rentgenowskim (czerwona linia na rys. 5.1). Zgodnie z założeniem w kolejnym etapie badań wykonano analizę UPLC otrzymanego GCM. Jak widać na rys. 5.2. efekty badań materiału wityfikowanego i kriomielonego są porównywalne. Jedyną różnicą jest zmienna powierzchnia obserwowanych pików. A zatem, przedstawione wyniki jednoznacznie sugerują brak degradacji termicznej leku, pod warunkiem że etap topienia materiału przeprowadzony będzie wystarczająco szybko. Dodatkowe testy UPLC wykazały, iż graniczny czas wygrzewania próbki wynosi 30 minut. Jednocześnie pojawia się pytanie: *O czym świadczy obecność kilku pików na chromatogramach amorficznych form GCM?*

Odpowiedzią na to pytanie mogą być rezultaty badań amorficznego glibenklamidu wykonane w 1991 roku, które pokazują, iż konwersja kryształu GCM do formy szklistej związana jest ze zmianą struktury cząsteczki będącej efektem wewnątrzcząsteczkowej reakcji transferu protonu. W efekcie amorficzna postać leku jest mieszaniną izomerów konstytucyjnych (tautomerów), tj. cząsteczek posiadających tę samą liczbę, tych samych atomów, ale inaczej z sobą połączonych. Zgodnie z terminologią zaproponowaną przez M. Hassana izomery nazwane zostały ketonem i enolem.⁹⁰ Jednak biorąc pod uwagę rodzaj wiązań chemicznych występujących w cząsteczce badanego leku, bardziej adekwatne wydaje się być nazwanie izomerów amidem i imidem, a reakcję transferu protonu jakiej ulega GCM tautomerizacją amidowo-imidową, a nie keto-enolową. Uzasadnienie graficzne takiej terminologii przedstawia rys. 5.3.



Rys. 5.3 Najczęściej obserwowane przykłady tautomerizacji: a) amidowo-imidowa, b) keto-enolowa. W przypadku tautomerii amidowo-imidowej obserwujemy przeniesienie atomu wodoru z azotu na tlen grupy karbonylowej. W efekcie między atomami węgla i azotu tworzy się wiązanie podwójne. Z kolei w przypadku tautomerii keto-enolowej na skutek transferu protonu tworzy się wiązanie C=C, a nie C=N.

Amidowe i imidowe izomery glibenklamidu przedstawia rys. 5.4. Jak łatwo zauważyć, w cząsteczce GCM występują dwa centra tautomeryzacji – jedno od strony grupy sulfonylomocznikowej oraz drugie w pobliżu pierścienia 5-chloro-2-metoksyfenylowego. A zatem cząsteczka GCM może występować w postaci trzech izomerów konstytucyjnych.



Rys. 5.4 Chemiczna struktura glibenklamidu: a) najbardziej stabilna forma amidowa, b) izomer imidowy od strony pierścienia 5-chloro-2-metoksyfenylowego, c) izomer imidowy grupy sulfonylomocznikowej.

Powróćmy teraz do interpretacji wyników badań UPLC przedstawionych wcześniej. Jak pamiętamy, na chromatogramie próbki krystalicznej widoczne były 2 piki, znacznie różniące się intensywnością. Z uwagi na to, że najbardziej stabilnym energetycznie izomerem badanego leku jest amid, przeważający w kryształach, możemy założyć, że pik o czasie retencji $t_R = 2.10$ min pochodzi od tego właśnie tautomeru. Jednocześnie, obecność drugiego piku świadczy o niewielkiej ilości form imidowych występujących w badanym roztworze. Interpretując w analogiczny sposób chromatogramy amorficznych próbek GCM możemy wywnioskować, iż zarówno kriomielona jak i witrifikowana forma leku jest mieszaniną trzech izomerów: amidowego ($t_R=2.10$) i dwóch imidowych ($t_R=0.86$ oraz $t_R = 1.2$), których ilość zależy od zastosowanej techniki otrzymania fazy szklistej. Procentową zawartość izomerów w badanych próbkach można określić na podstawie analizy powierzchni pików widocznych na chromatogramach UPLC. Jak pokazuje tabela 5.1 w przypadku amorficznej próbki otrzymanej techniką mielenia w temperaturze azotu, zawartość izomerów imidowych wynosi nieco ponad 5%. Zdecydowanie większa ilość pojawia się, gdy amorficzny materiał wytworzony zostanie metodą izobarycznego schładzania cieczy – 16%.

Tabela 5.1 Ilościowa interpretacja chromatogramów UPLC badanych próbek GCM.

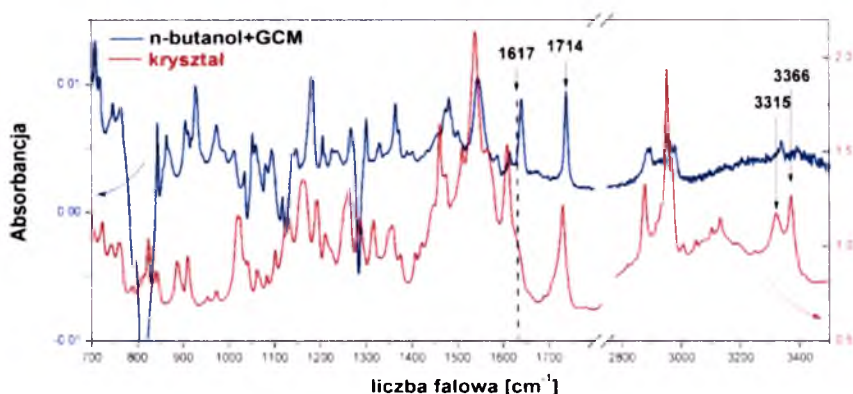
Rodzaj analizowanej próbki	Czas retencji [min]	Powierzchnia piksu [%]
kryształ	0.86	0.14
	2.10	99.86
próbka witrifikowana (1 min w T _m)	0.86	14.42
	1.19	1.33
	2.10	84.25
próbka kriomielona	0.86	5.02
	1.25	0.26
	2.10	94.66
próbka witrifikowana (60 min w T _m)	0.57	0.19
	0.86	89.63
	1.53	4.95
	2.10	5.23

Co ciekawe, w artykule mówiącym o termicznej degradacji glibenklamidu, podano bardzo zbliżoną procentową zawartość produktów rozkładu leku (16.04 %).⁹² A zatem możemy przypuszczać, iż autorzy wspomnianej publikacji błędnie zinterpretowali wyniki chromatograficzne, traktując tautomery GCM jako produkty jego termicznej degradacji.

Aby bardziej szczegółowo scharakteryzować zmiany strukturalne towarzyszące tworzeniu fazy szklistej glibenklamidu, wykorzystując technikę FT-IR, przeprowadziliśmy kompleksową charakterystykę krystalicznej formy GCM oraz jego amorficznych postaci w szerokim zakresie temperatur. Wyniki badań przedstawiono w kolejnym paragrafie.

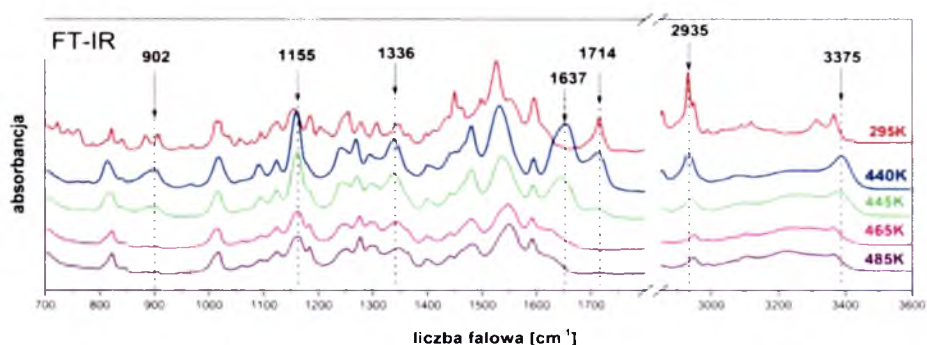
5.1.1 Badania stabilności z wykorzystaniem techniki FT-IR

Badania FT-IR rozpoczęto od zarejestrowania widm krystalicznego glibenklamidu (Rys. 5.5). Zgodnie z interpretacją przedstawioną w pracach [92,93] dwa charakterystyczne pasma obserwowane na widmie krystalicznej formy GCM – 3315 oraz 3366 cm⁻¹, przypisane zostały wiązaniom N-H odpowiednio amidowego i mocznikowego fragmentu cząsteczki. Następne, wyraźne pasmo, widoczne dla ν = 1714 cm⁻¹ odpowiada natomiast drganiom rozciągającym grupy karbonylowej (νC=O) występującej w sulfonilomocznikowym fragmencie cząsteczki. Z kolej pasmo będące wynikiem drgań drugiej grupy karbonylowej obecnej w cząsteczce GCM jest słabo widoczne (ν = 1617 cm⁻¹). Dlatego też, dodatkowo wykonano pomiar FT-IR roztworu glibenklamidu w n-butanolu (niebieska linia na rys. 5.5), który wyraźnie pokazuje obecność pasma 1617 cm⁻¹ przypisanego drganiu grupy C=O.



Rys. 5.5 Widmo FT-IR roztworu *n*-butanol - glibenklamid (niebieska linia) oraz krystalicznej formy GCM (czerwona linia).

Kontynuując analizę stabilności chemicznej glibenklamidu wykonano pomiary FT-IR krystalicznej formy leku w szerokim zakresie temperatur, 295 - 485 K. Tego rodzaju pomiary umożliwiające dokładne opisanie zmian strukturalnych towarzyszących tworzeniu fazy szklistej glibenklamidu metodą izobarycznego schładzania cieczy. W pierwszym etapie badań krystaliczną próbkę GCM ogrzano od 300 K do temperatury topnienia materiału równej 440 K, rejestrując widma IR w temperaturowych odstępach równych 10 K. W kolejnym etapie badany materiał został ogrzany do 485 K, natomiast widma rejestrowano co 20 K. Wynik tak przeprowadzonych pomiarów przedstawiony został na rys. 5.6. Z uwagi na to, że widma zarejestrowane w zakresie temperatur 300 - 430 K nie różniły się między sobą, dane te nie zostały przedstawione.



Rys. 5.6 Dane FT-IR zarejestrowane w procesie podgrzewania próbki GCM w zakresie temperatur 295 – 485 K.

Już na pierwszy rzut oka widmo IR zarejestrowane w $T_m=440$ K zdecydowanie różni się od tego zmierzonego w temperaturze pokojowej. Oprócz ogólnej zmiany kształtu linii spektralnej, będącej efektem wpływu temperatury na próbkę, możemy zaobserwować

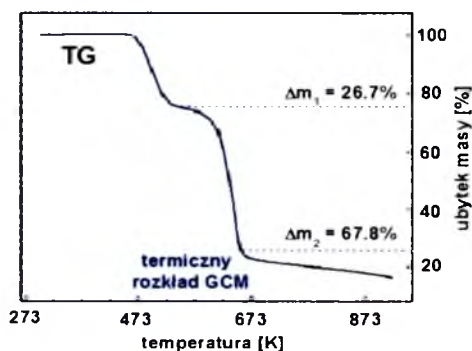
wyraźny zanik pików N-H obecnego na widmie krystalicznego materiału dla $\nu = 3315 \text{ cm}^{-1}$, podczas gdy intensywność pasma pochodzącego od rozciągającego drgania N-H dla $\nu = 3366 \text{ cm}^{-1}$ wydaje się pozostawać niezmienna. Kolejne różnice to znaczący spadek intensywności pasma przypisanego drganiu C=O mocznikowej części molekuly oraz pojawienie się pików o $\nu = 1637 \text{ cm}^{-1}$, który zgodnie z danymi literaturowymi odpowiada rozciągającemu drganiu wiązania C=N. Wyraźny zanik pasm C=O i N-H oraz jednocześnie pojawienie się pików odpowiadających drganiu C=N, na widmie FT-IR stopionej próbki glibenklamidu jednoznacznie pokazuje, iż konwersja amidowej formy GCM do imidowej, sugerowana badaniami UPLC, rozpoczyna się podczas topienia substancji krystalicznej. Z kolei dalsze podgrzewanie próbki, zwłaszcza powyżej $T = 460 \text{ K}$, skutkuje wyraźnymi zmianami na widmie IR. Obserwujemy spadek intensywności kilku pasm:

- 1155 cm^{-1} , które przypisane jest drganiu wiązania βCNH zlokalizowanego w sulfonilomocznikowym fragmencie molekuly,
- 1336 cm^{-1} , związanego z drganiem γCH_2 , atomów występujących w środkowej części cząsteczki GCM,
- 2935 cm^{-1} , przypisanego symetrycznym drganiom grupy CH_2 cykloheksanu,
- 3366 cm^{-1} , które utożsamiane jest z drganiem grupy N-H,

oraz całkowity zanik kolejnych:

- 902 cm^{-1} , związanego z drganiem γCH_2 cykloheksanu,
- 1714 cm^{-1} , które świadczy o drganiu wiązania C=O mocznikowego rejonu cząsteczki GCM.

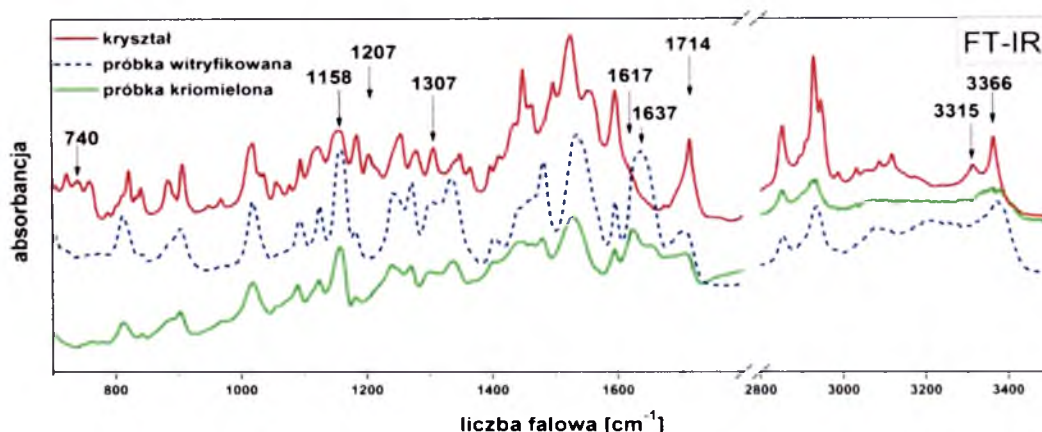
Opierając się na powyższych wynikach możemy wnioskować, iż próbka glibenklamidu jest stabilna chemicznie do temperatury przewyższającej T_m o 20 K, tj. 460 K. Wynik ten jest zgodny z danymi termogravimetrycznymi (TG) przedstawionymi w pracy [94]. Jak pokazuje



krzywa TG przedstawiona na rys. 5.7 podczas podgrzewania próbka GCM dwukrotnie paruje. Pierwszy gwałtowny ubytek masy przekraczający 26 %, obserwujemy w temperaturze 460 K. Z kolei kolejne parowanie próbki, świadczące o jej znacznym rozkładzie termicznym ma miejsce w $T = 660 \text{ K}$.

Rys. 5.7 Krzywa TG glibenklamidu (Rysunek zaczerpnięty został z pracy [94]).

W kolejnym etapie badań stabilności chemicznej glibenklamidu techniką spektroskopii w podczerwieni wykonaliśmy pomiary amorficznych próbek leku, otrzymanych metodą kriomielenia i witrifikacji. Jak łatwo zauważyć na rys. 5.8, widma IR zarejestrowane dla amorficznych form glibenklamidu (niebieska i zielona linia) zdecydowanie różnią się od linii kryształu. Jeśli jednak porównamy je z danymi przedstawionymi na rys. 5.6, możemy łatwo zauważyć, że widma IR amorficznej próbki otrzymanej metodą izobarycznego chłodzenia stopu oraz kryształu w T_m są tożsame.



Rys. 5.8 Widmo IR krystalicznej (czerwona linia) i amorficznych form GCM otrzymanych metodą witrifikacji (przerywana niebieska linia) oraz mielenia kriogenicznego (zielona linia).

A zatem możemy przypuszczać, że równowaga pomiędzy tautomerami GCM osiągnięta podczas topienia próbki ulega „zamrożeniu” podczas szybkiego chłodzenia układu do fazy szklistej. Ponieważ jedyną znaczącą różnicą pomiędzy widmami IR próbek kriomielonej i witrifikowanej jest wyraźna obecność pasma odpowiadającego rozciągającemu drganiu grupy karbonylowej $C=O$, zlokalizowanej od strony pierścienia 5-chloro-2-metoksyfenylowego, na widmie materiału amorfizowanego w temperaturze ciekłego azotu, możemy również wnioskować, że formy imidowe GCM pojawiają się również w kriomielonym materiale. Wynik ten jest bardzo interesujący, szczególnie na tle badań dotyczących zjawiska mutarotacji. Proces ten jest łańcuchowo-pierścieniową reakcją tautomerizacji przebiegającą w roztworach cukrów redukujących oraz w ich amorficznych formach, otrzymanych metodą witrifikacji. Wtedy też obserwuje się dynamiczną równowagę pomiędzy tautomerami. Natomiast w przypadku próbek poddanych mechanicznemu mieleniu przyjmuje się, że mutarotacja nie zachodzi. Oznacza to, że w amorficznej próbce fruktozy czy laktozy, otrzymanej tą metodą, obecny jest tylko jeden, wyjściowy anomer cukru.⁹⁵ Z kolei w przypadku glibenklamidu mamy do czynienia z całkowicie odmienną sytuacją ponieważ

mniej stabilne imidowe izomery pojawiają się także w kriomielonej próbce leku. Dodatkowo, w tym miejscu warto nadmienić, iż zgodnie z danymi literaturowymi imidowe formy GCM obecne są również w amorficznym materiale otrzymanym metodą mielenia kulowego.⁹²

Niestety, jak dotąd mechanizm reakcji tautomeryzacji inicjowanej mieleniem nie został poznany. Dlatego też, nie jesteśmy w stanie wytłumaczyć, dlaczego proces tautomeryzacji jest aktywowany pod wpływem stresu mechanicznego natomiast mutarotacja nie. Do wyjaśnienia tego zagadnienia potrzebnych jest zdecydowanie więcej przykładów eksperymentalnych. Natomiast w chwili obecnej poza badanym glibenklamidem znane są jedynie dwa przykłady leków, których amorficzna mielona forma zawiera mniej stabilne izomery konstytucyjne. Substancjami tymi są piroxicam⁹⁶ oraz indapamid, lek moczopędny, badany obecnie w laboratorium Instytutu Fizyki UŚ.

Wyniki badań FT-IR amorficznych próbek glibenklamidu przedstawione dotychczas jednoznacznie potwierdzają wcześniejsze sugestie, iż konwersji kryształu GCM do fazy szklistej towarzyszy pojawienie się imidowych izomerów leku. Nasuwa się więc pytanie, *która część molekuly GCM jest najbardziej „narażona” na reakcję transferu protonu?*

Jak zostało wspomniane wcześniej cząsteczka analizowanej substancji posiada dwa potencjalne centra tautomeryzacji: region sulfonilomocznikowy, obecny we wszystkich lekach przeciwcukrzycowych badanych w niniejszej pracy, oraz fragment amidowy związany z pierścieniem aromatycznym. Zgodnie z literaturową interpretacją widm IR GCM, przedstawioną powyżej, podczas formowania fazy szklistej może powstawać jedynie izomer o strukturze przedstawionej na rys. 5.4b. Jednak wyniki badań UPLC opisane w poprzednim paragrafie sugerują obecność, w amorficznej próbce leku dwóch tautomerów imidowych. Aby wyjaśnić te rozbieżności wykonano symulacje komputerowe widma w podczerwieni dla amidowego izomeru cząsteczki GCM. Wyniki zestawione wraz z danymi eksperymentalnymi przedstawia tabela 5.2. Na ich podstawie można wywnioskować, że interpretacja pasm 3366 oraz 3315 cm⁻¹ widocznych na widmie IR krystalicznej próbki GCM powinna być inna niż ta przedstawiona powyżej. A mianowicie, ostatnie intensywne pasmo na widmie IR (Rys. 5.5) należy przypisać drganiu wiązania N-H zlokalizowanego w pobliżu pierścienia chlorometoksyfenylowego, podczas gdy pik 3315 cm⁻¹ świadczy o drganiu rozciągającym wiązania N-H mocznikowego fragmentu cząsteczki. Przyjmując taką interpretację pasm IR możemy wnioskować, iż reakcja transferu protonu w sulfonilomocznikowej części molekuly GCM jest o wiele bardziej prawdopodobna, niż tautomeryzacja na przeciwnym końcu cząsteczki. W konsekwencji możemy przyjąć, że amorficzna postać leku jest mieszaniną

wszystkich trzech izomerów przedstawionych na rys. 5.4, jednak imidowych form mocznikowych (Rys. 5.4c) jest więcej niż cząsteczek przedstawionych na rys 5.4b. Wynik ten potwierdzają również obliczenia kwantowo-mechaniczne, zgodnie z którymi energia aktywacji procesu tautomeryzacji od strony pierścienia chlorometoksyfenylowego jest większa (163 kJ/mol) niż bariera energetyczna reakcji transferu protonu w sulfonilomocznikowej części molekuly (148 kJ/mol).

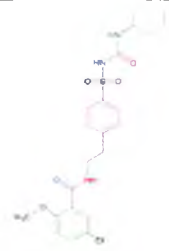
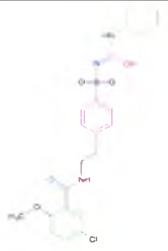
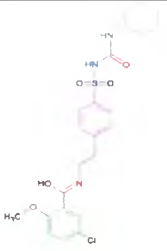
Tabela 5.2 Zestawienie ważniejszych drgań IR amidowego izomeru molekuly GCM.

Rodzaje drgań	Symulacje	Eksperyment	Rodzaje drgań	Symulacje	Eksperyment
ν_{NH}	3499	3366	$\beta_{\text{CNH}} + \beta_{\text{CNH}} + \delta_{\text{CH2}}$	1363	1365
ν_{NH}	3458	3315	γ_{CH2}	-	1348
ν_{NH}	3404	-	γ_{CH2}	1308	1305
$\nu_{\text{sym}}\text{CH} + \nu_{\text{sym}}\text{CH}$	3024	3034-3116	β_{CH}	1260	1255
$\nu_{\text{sym}}\text{CH2}$	2968	2935	β_{CH2}	1242	-
$\nu_{\text{as}}\text{CH2}$	2927	2856	$\beta_{\text{CNH}} + \gamma_{\text{CH3}} + \nu_{\text{sym}}\text{CC (ring)}$	1226	1205
$\nu_{\text{sym}}\text{C=O} + \delta_{\text{NH}} + \delta_{\text{NH}}$	1754	1714	$\beta_{\text{CNH}} + \beta_{\text{CNH}}$	1168	1153
$\nu_{\text{sym}}\text{C=O} + \delta_{\text{CNH}}$	1681	1617	$\nu_{\text{sym}}\text{CC (ring)} + \beta_{\text{CH}} + \nu_{\text{sym}}\text{SO2}$	1056	1056
$\nu_{\text{as}}\text{CC (ring)} + \delta_{\text{CH}}$	1596	1597	$\nu_{\text{as}}\text{CC (ring)} + \nu_{\text{CO z CH3}}$	1029	1020
$\nu_{\text{as}}\text{CC (ring)} + \delta_{\text{CH}}$	1567	1552	β_{CH}	1260	1255
β_{CNH}	1525	1527	$\nu_{\text{sym}}\text{CN} + \gamma_{\text{CH2}} + \nu_{\text{as}}\text{CC (ring)}$	988	966
δ_{CH3}	1484	1498	-	-	
$\delta_{\text{CH2}} + \delta_{\text{CNH}}$	1478	-	γ_{CH2}	939	908
ω_{CH2}	1448	1450	γ_{CH2}	878	883
ω_{CH3}	-	1411	$\nu_{\text{as}}\text{CNH} + \nu_{\text{as}}\text{CC (ring)}$	859	840

* drgania: ν – rozciągające, δ – nożycowe, β – wahadłowe, ω – wachlarzowe, γ – skręcające,
** kolory poszczególnych drgań odpowiadają wiązaniom GCM przedstawionym na rys. 5.4a.

Łącząc powyższe informacje z analizą danych chromatograficznych przedstawioną w tabeli 5.1 możemy określić ilościowo zawartość poszczególnych tautomerów w amorficznych próbkach GCM. Procentowy udział izomerów amidowych i imidowych przedstawia tabela. 5.3.

Tabela 5.3 Procentowy udział izomerów amidowych i imidowych w kryształach oraz amorficznych formach GCM.

Badana próbka GCM	Amid [%]	Imid (1) [%]	Imid (2) [%]
			
kryształ	99.86	0.14	-
próbka wityfikowana (1 min w T _m)	84.25	14.42	1.33
próbka kriomielona	94.66	5.02	0.26

W tym miejscu warto nadmienić, iż zjawisko tautomerizacji możemy obserwować głównie w rozpuszczalniku lub w fazie amorficznej, ponieważ jedynie w takich warunkach transfer protonu między izomerami jest możliwy. Rezultatem takiej spontanicznej „wędrowki” protonu jest ustalenie się dynamicznej równowagi pomiędzy dwiema (lub więcej) formami danego związku. Jednak dokładne proporcje między tautomerami zależą od czynników fizycznych, takich jak temperatura czy ciśnienie, oraz chemicznych obejmujących rodzaj rozpuszczalnika oraz jego pH. Warto także zauważyć, iż istnieją rozpuszczalniki hamujące reakcję transferu protonu, np. woda oraz inne, akcelerujące ten proces. Dlatego też, możemy przypuszczać, że procentowa zawartość izomerów przedstawiona w tabeli 5.3, oznaczona dla roztworu acetonitryl : woda (w stosunku objętościowym 80:20) może nieco różnić się od tej ustalonej w ciele stałym. Jednak badania UPLC wykonane zaraz po rozpuszczeniu GCM w roztworze acetonitryl : woda oraz następnego dnia po pierwszym pomiarze pokazały, iż nie ma znaczących różnic w procentowej zawartości form amidowych i imidowych między badanymi roztworami. A zatem możemy przyjąć, że proporcje tautomerów przedstawione w tabeli 5.3 odzwierciedlają ich zawartość w amorficznej formie leku.

Podsumowując badania dotyczące chemicznej stabilności GCM, przedstawione w niniejszym paragrafie, możemy powiedzieć, że:

- Amorficzną postać leku można otrzymać stosując zarówno technikę izobarycznego schładzania cieczy jak i mielenie w warunkach kriogenicznych.
- Termiczna dekompozycja GCM w T_m , sugerowana w literaturze, nie zachodzi pod warunkiem, że czas wygrzewania próbki nie przekracza 30 minut.
- Maksymalna temperatura do jakiej można podgrzać GCM bez ryzyka degradacją próbki, wynosi 460 K. Powyżej tej temperatury GCM ulega rozpadowi. Badania z wykorzystaniem techniki NMR pokazały, iż degradacja następuje w miejscu wiązania C-N występującym w sulfonylomocznikowym fragmencie cząsteczki.
- Zarówno mieleniu jak i topieniu badanego leku towarzyszy reakcja transferu protonu, w wyniku której amorficzne materiały GCM stanowią mieszaninę amidowych i imidowych izomerów.

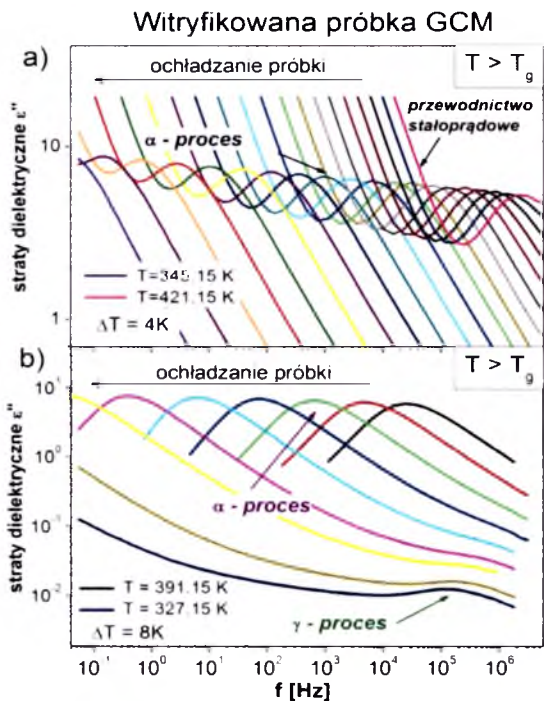
5.2 Dynamika molekularna oraz fizyczna stabilność amorficznej formy GCM w ciśnieniu atmosferycznym

Badania dynamiki molekularnej cieczy tworzących szkliwa mogą być wykonywane przy pomocy różnorodnych technik pomiarowych. Jednak w niniejszej pracy do analizy przejścia ciecz-szkło glibenklamidu wybrano metodę szerokopasmowej spektroskopii dielektrycznej (BDS), dającą możliwość monitorowania ruchliwości molekuł w bardzo szerokim zakresie częstotliwości ($10^{-2} < f(\text{Hz}) < 10^9$) oraz temperatur (od -165°C do 400°C).

5.2.1 Molekularna ruchliwość fazy przechłodzonej witrifikowanej próbki GCM

Widma strat dielektrycznych witrifikowanej próbki glibenklamidu zarejestrowane w ciśnieniu atmosferycznym w bardzo szerokim zakresie temperatur zostały przedstawione na rys. 5.9. Jak łatwo zauważyć oprócz relaksacji strukturalnej α , odzwierciedlającej kooperatywny ruch molekuł GCM, krzywe absorpcji $\epsilon''(f)$ cieczy przechłodzonej badanego leku w zakresie niskich częstości, charakteryzuje obecność przewodnictwa stałoprądowego związanego z translacyjnym ruchem jonów obecnych w próbce. Ponieważ wraz z obniżaniem temperatury dokładna identyfikacja maksimum piku $\epsilon''(f)$ jest coraz trudniejsza, wpływ

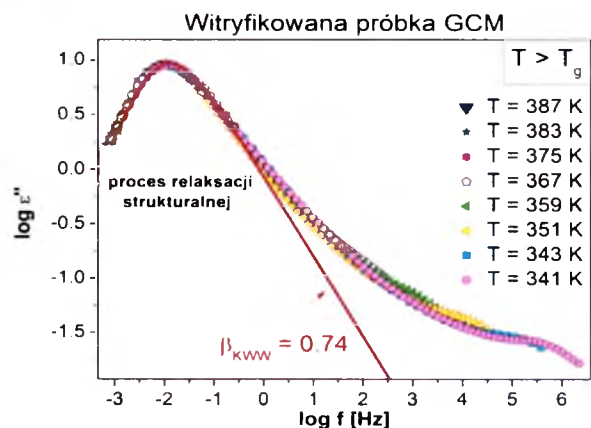
przewodnictwa stałoprądowego został odjęty od całkowitego widma strat dielektrycznych. Procedura ta wykonana została przy pomocy programu WinFIT firmy Novocontrol, a jej efekt przedstawiony został na rys. 5.9b. Łatwo zauważyć, iż podczas ochładzania próbki maksimum piku relaksacji strukturalnej przesuwają się w stronę niskich częstotliwości, a w $T = 345\text{ K}$ znika z okna pomiarowego. W tej temperaturze relaksacja α staje się zbyt wolna, aby obserwować ją eksperymentalnie. W zamian pojawia się kolejny proces relaksacyjny – γ , którego natura zostanie omówiona w następnym podrozdziale.



Rys. 5.9 Widma strat dielektrycznych witrifikowanej próbki GCM zarejestrowane w czasie pomiarów izobarycznych w ciśnieniu atmosferycznym, w zakresie temperatur 345-421 K. Panel b przedstawia krzywe strat dielektrycznych otrzymane po odjęciu wpływu przewodnictwa stałoprądowego.

Wielu ciekawych informacji dostarcza analiza kształtu krzywej absorpcji α w szerokim zakresie temperatur. Dla wielu związków zarówno małowcząstkowych jak i polimerów zaobserwowano poszerzanie się piku relaksacji strukturalnej wraz z przybliżaniem się do fazy szkła.^{97,98} Dla innych, natomiast, obserwuje się stałość parametrów kształtu w całym badanym obszarze.⁹⁹ Własność obserwowana w drugim przypadku nazywana jest superpozycją czasowo-temperaturową. Aby sprawdzić, czy kształt procesu relaksacji strukturalnej GCM spełnia wspomnianą zasadę superpozycji, wybrane widma strat dielektrycznych zarejestrowane powyżej temperatury zeszklenia GCM zostały nałożone na siebie tworząc tzw. „masterplot”. Otrzymany wynik, przedstawiony w skali podwójnie logarytmicznej, na rys. 5.10 wyraźnie pokazuje, iż szerokość krzywej absorpcji nie zależy od temperatury.

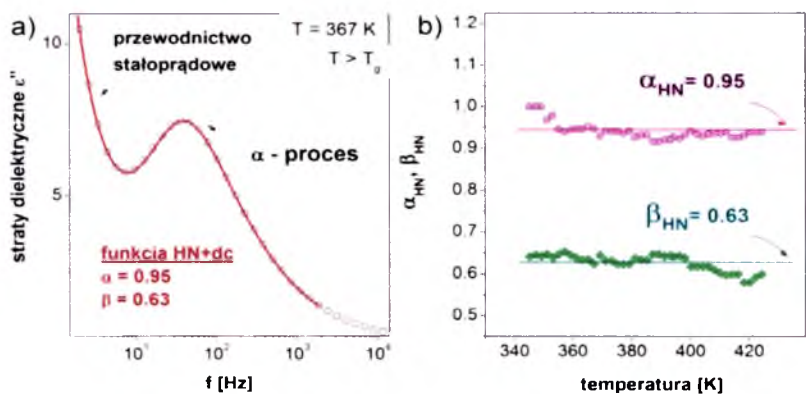
Aby dokładnie sparametryzować kształt krzywej $\varepsilon''(f)$, proces α został opisany za pomocą częstotliwościowej postaci funkcji KWW (równ. 2.16). Wynik tego dopasowania, wraz z uzyskaną wartością parametru poszerzenia eksponencjalnego β_{KWW} przedstawia rys. 5.10.



Rys. 5.10 Masterplot'' złożony z krzywych strat dielektrycznych GCM zarejestrowanych w różnych temperaturach powyżej T_g . Czerwoną linią zaznaczono funkcję KWW dla parametru rozmycia $\beta=0.74$.

W tym miejscu warto nadmienić, że zgodnie z sugestią Shamblin'a⁸⁷ mówiącą o tym, iż stabilność fizyczna amorficznych substancji leczniczych powinna rosnąć wraz ze wzrostem parametru β_{KWW} , amorficzny GCM powinien charakteryzować się niewielką tendencją do rekrytalizacji. I rzeczywiście, patrząc na widma strat dielektrycznych przedstawione na rys. 5.91, nawet podczas podgrzewania próbki do temperatury 421 K nie obserwujemy żadnych oznak rekrytalizacji układu. Co ciekawe, identyczną wartość parametru β_{KWW} otrzymano podczas analizy szerokości krzywych absorpcji chlorpropamidu (rozdział 4.2), który w odróżnieniu od GCM, okazał się bardzo niestabilny fizycznie. A zatem możemy wnioskować, że szerokość pików relaksacji strukturalnej nie odgrywa znaczącej roli wśród czynników determinujących stabilność amorficznych leków PSM. W przypadku GCM jego stabilność fizyczna wynika raczej z faktu, iż jest on mieszaniną izomerów konstytucyjnych.

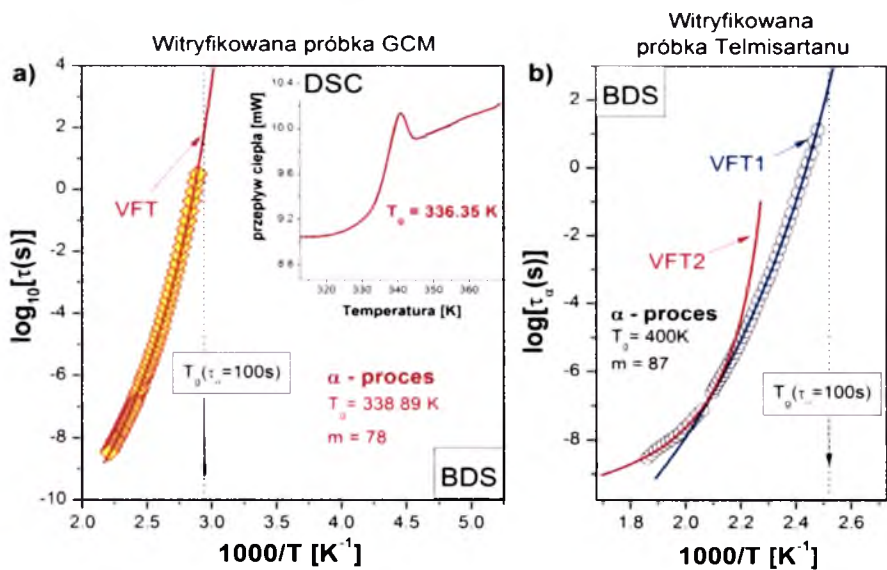
Innym sposobem parametryzacji kształtu pików strat dielektrycznych jest zastosowanie aproksymacji równaniem Havriliaka i Negami. Dlatego też, w kolejnym etapie analizy danych dielektrycznych GCM wykonano dopasowanie funkcji HN (równ. 2.18) do danych zarejestrowanych powyżej temperatury zeszklenia GCM. Przykładową aproksymację krzywej strat dielektrycznych przedstawia czerwona linia na rys. 5.11a.



Rys. 5.11 Panel (a): wybrane widmo strat dielektrycznych zarejestrowane powyżej temperatury przejścia szklistego w ciśnieniu atmosferycznym dla GCM. Czerwona linia ciągła przedstawia dopasowanie funkcją HN. Panel (b) przedstawia parametry kształtu α oraz β (z równ. 2.18) otrzymane dla procesu relaksacji strukturalnej GCM w różnych temperaturach.

Z kolei parametry kształtu α i β , uzyskane dla wszystkich zarejestrowanych procesów relaksacji strukturalnej, obrazuje rys. 5.1b. Otrzymany wynik wyraźnie potwierdza, iż GCM spełnia zasadę czasowo-temperaturowej superpozycji.

Wykorzystując parametry dopasowania funkcji HN do danych eksperymentalnych można dokładnie wyznaczyć czas relaksacji τ będący odwrotnością częstotliwości położenia maksimum strat dielektrycznych f_{max} . Wynikiem tak przeprowadzonych analiz jest temperaturowa zależność czasów relaksacji strukturalnej GCM przedstawiona na rys. 5.12a.

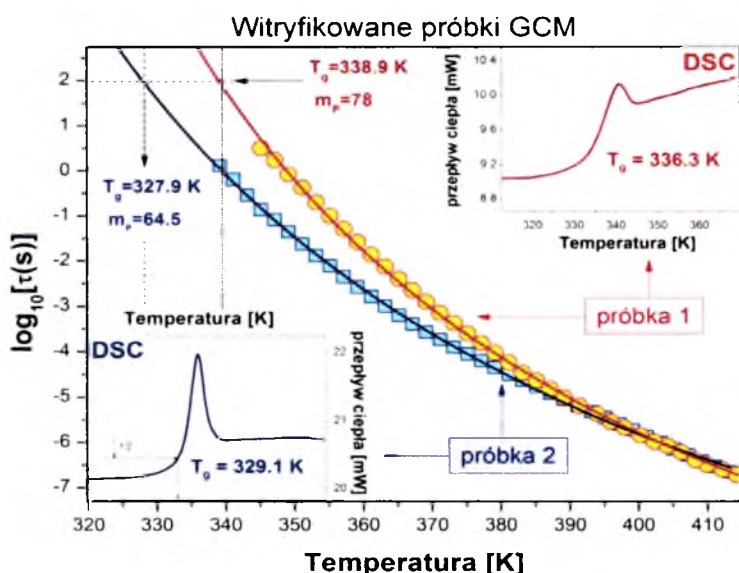


Rys. 5.12 Panel (a) przedstawia temperaturową zależność czasów relaksacji strukturalnej witrifikowanej próbki GCM, z kolei wstawka do rysunku skok ciepła właściwego mierzony techniką DSC, charakteryzujący przejście szkliste GCM. Z kolei panel (b) zależność $\tau_a(1/T)$ witrifikowanej próbki telmisartanu opisaną dwoma równaniami VFT.

Jak łatwo zauważyć temperaturowa zależność czasów relaksacji strukturalnej wykazuje typowo niearrheniusowski charakter. Dlatego też, dane eksperymentalne zostały opisane funkcją VFT (równ.1.1). W tym miejscu warto zaznaczyć, iż do sparametryzowania tak szerokiego zakresu czasów relaksacji, obejmującego ok. 10 dekad τ , zastosowano tylko jedno równanie VFT o następujących parametrach: $\log\tau_\infty=-15.63\pm0.13$, $D_T=11.95\pm0.35$, $T_0=262\pm1$ K. Oznacza to, iż tzw. zjawisko „*dynamic crossover*”¹⁰⁰, polegające na zmianie charakteru krzywej $\log\tau_\alpha(T)$, obserwowane dla większości cieczy tworzących szkliwa, w tym chociażby dla telmisartanu - substancji o działaniu przeciwnadciśnieniowym (Rys. 5.12b), w przypadku GCM nie jest obserwowane.

Na podstawie ekstrapolacji funkcji VFT do wartości $\log\tau_\alpha=2$ wyznaczono parametry charakteryzujące badany amorficzny GCM. A mianowicie temperaturę przejścia szklistego T_g dla $\tau_\alpha=100$ s oraz kruchość izobaryczną m_P (równ.1.2). W pierwszej kolejności oszacowano wartość temperatury zeszklenia jako $T_g=338.9$ K. Podobną wielkość ($T_g=336$ K) uzyskano również na podstawie pomiarów kalorymetrycznych. Termogram DSC przedstawiający efekt endotermiczny związanym z przejściem szklistym badanej substancji, przedstawia wstawka do rys.5.13a. Należy tutaj jednak wspomnieć, iż obie wyznaczone przez nas wartości temperatury zeszklenia wiotryfikowanego glibenklamidu znacznie odbiegają od tych opublikowanych w artykule [92]. Na podstawie badań DSC autorzy wspomnianej pracy oszacowali T_g dla próbek otrzymanych metodami izobarycznego schładzania cieczy (323 K) oraz mielenia kulowego (343 K), jednocześnie sugerując przyczynę uzyskanych rozbieżności jako termiczną degradację wiotryfikowanego materiału. Jednak, biorąc pod uwagę dane eksperymentalne przedstawione w poprzednim paragrafie niniejszej pracy, negujące pogląd o rozkładzie termicznym GCM w T_m , należy oczekiwać innej przyczyny otrzymanych rozbieżności. Jednym z możliwych powodów może być silna tendencja badanej próbki do izomeryzacji. Jak zostało wspomniane wcześniej często zdarza się, iż dwa tautomery jednego związku chemicznego charakteryzują się odmiennymi własnościami fizyczno-chemicznymi, takimi jak chociażby moment dipolowy, współczynnik refrakcji czy właśnie temperatura zeszklenia. Dlatego też możemy przypuszczać, iż otrzymane różnice w temperaturze przejścia szklistego wynikają z odmiennej koncentracji izomerów imidowych w badanych próbkach GCM. Aby sprawdzić słuszność tego założenia wykonano dodatkowy pomiar zespolonej przenikalności dielektrycznej, w szerokim zakresie temperatur, dla próbki GCM charakteryzującej się odmienną „historią termiczną”. Podczas gdy widma poprzedniego badanego materiału rejestrowane były podczas obniżania temperatury, kolejna próbka została

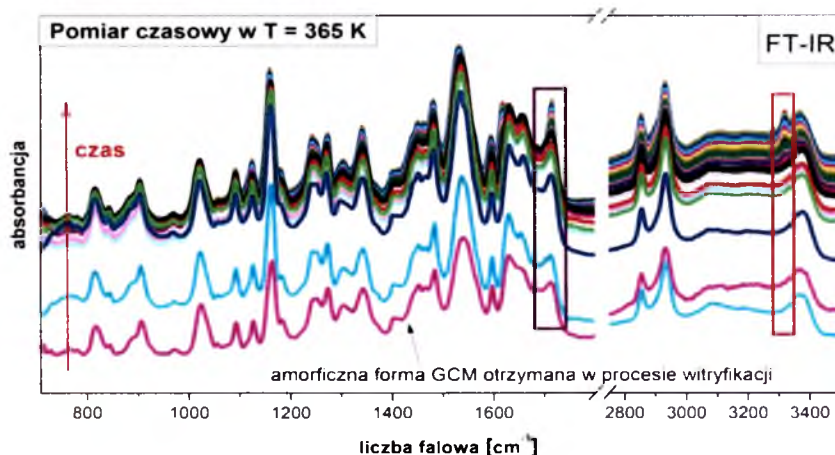
szybko przechłodzona, a następnie powoli ogrzewana. Tego typu procedurę zastosowano, ponieważ uważa się, iż reakcja transferu protonu jest procesem aktywowanym termicznie. W konsekwencji temperatura oraz czas wygrzewania próbki istotnie wpływają na osiągnięty stan równowagi między izomerami. Otrzymany wynik, w postaci nowej temperaturowej zależności czasów relaksacji, przedstawia niebieska linia na rys. 5.13.



Rys. 5.13 Temperaturowe zależności czasów relaksacji strukturalnej próbek GCM, świeżo przygotowanej (próbka nr 2) oraz w stanie równowagi dynamicznej między izomerami (próbka nr 1).

Powyższy wykres wyraźnie pokazuje niemal dziesięciostopniową różnicę w temperaturze zeszklenia badanych próbek. Co więcej, właściwie ta sama różnica w wartościach T_g obydwu analizowanych materiałów została osiągnięta w eksperymencie DSC. Otrzymany rezultat wydaje się więc potwierdzać wcześniejsze przypuszczenie o wpływie sposobu przygotowania próbki do badań, a w konsekwencji koncentracji tautomerów, na temperaturę przejścia szklistego GCM. Pojawia się więc pytanie, która próbka GCM nr 1 czy 2 charakteryzuje się większym stężeniem imidów? Ponieważ spektroskopia dielektryczna nie daje możliwości odpowiedzi na to pytanie, aby rozwiązać przedstawiony problem przeprowadzono badania techniką FT-IR. Jak pokazuje rys. 5.14 podczas wygrzewania próbki w temperaturze $T = 365\text{ K}$ intensywność pasm przypisanych drganiom wiązania N-H (3366 cm^{-1}) oraz C=O (1714 cm^{-1}) sulfonilomocznikowej części molekuly GCM wyraźnie wzrasta, co jednoznacznie sugeruje wzrost koncentracji form amidowych podczas równowagowania próbki. A zatem, możemy wnioskować, iż świeżo przygotowany lek (próbka nr 1)

charakteryzuje się większym stężeniem form imidowych w porównaniu z materiałem, w którym ustaliła się dynamiczna równowaga między tautomerami (próbka nr 2).



Rys. 5.14 Widma FT-IR zarejestrowane podczas pomiaru czasowego w $T = 365\text{ K}$, amorficznej witryfikowanej próbki GCM. Linia fioletowa przedstawia pierwsze zarejestrowane widmo. Z kolei zmiany intensywności pasm odpowiadających drganiom C=O i N-H wskazują odpowiednio fioletowa i czerwona ramka.

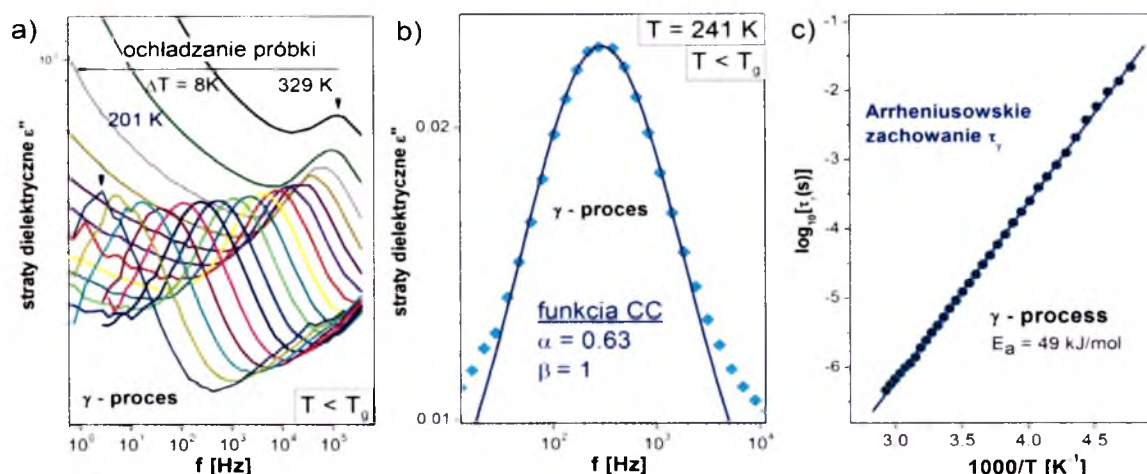
Ponieważ najbardziej charakterystyczną cechą dynamiki molekularnej cieczy tworzących szkliwa jest systematyczne odchylenie temperaturowej zależności czasów relaksacji strukturalnej od przebiegu liniowego, w kolejnym etapie analizy danych dielektrycznych wykonano obliczenia tzw. parametru kruchości izobarycznej m_P , będącego ilościową miarą niearrheniusowskiego charakteru krzywej $\log \tau_a(T)$ (równ. 1.2). Jak pokazuje rys. 5.13 próbki charakteryzujące się odmienną koncentracją izomerów imidowych różnią się nie tylko wartością temperatury zeszklenia, ale także parametrem m_P . W przypadku materiału o większym stężeniu form imidowych otrzymano wartość kruchości równą 64.5, która jest aż o 14 jednostek mniejsza, niż ta wyznaczona dla próbki nr 1. A zatem możemy przypuszczać, że parametr kruchości dynamicznej może być wskaźnikiem zmian strukturalnych zachodzących w amorficznej próbce GCM. Ponadto powszechnie wiadomo, iż kruchość jest jednym z czynników mogących posłużyć do przewidywania stabilności fizycznej amorficznych substancji. Zakłada się, że im niższy parametr m_P tym mniejsza tendencja układu do rekrytalizacji. Zgodnie z tą zasadą próbka o mniejszym procentowym udziale izomerów imidowych powinna charakteryzować się większą skłonnością do dewitrifikacji. Pogląd ten zostanie zweryfikowany w dalszej części niniejszej pracy.

5.2.2 Identyfikacja molekularnego pochodzenia drugorzędowych procesów relaksacyjnych GCM

Podczas przejścia ciec-z-szkło, kiedy czasy relaksacji strukturalnej α stają się zbyt długie, aby móc wyznaczyć je eksperymentalnie, na widmie dielektrycznym zaczynają dominować szybsze procesy drugorzędowe (zwane β , γ , itd.) dostarczające informacji o dynamice molekularnej szkielet. Generalnie II-rzędowe procesy relaksacyjne możemy podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje relaksacje typu Johari-Goldstein (JG) pochodzące od niewielkich rotacyjnych i translacyjnych ruchów molekuly uwięzionej w klatce utworzonej przez sąsiednie cząsteczki. Tego typu procesy, uważane za prekursora relaksacji strukturalnej, charakteryzują się wrażliwością na zmiany otoczenia, polegające chociażby na zwiększeniu gęstości układu. Z kolei do drugiej grupy należą wewnątrzcząsteczkowe lokalne zmiany konformacyjne molekuly, tzw. procesy „non-JG”, uniezależnione od ruchu sąsiednich cząsteczek. Jednak czasem zdarza się, iż zmiany konformacyjne wymagają dodatkowej dostępnej objętości. Ma to miejsce szczególnie wtedy, gdy ruch dotyczy dużego fragmentu molekuly. Dlatego też, często mówi się o trzeciej grupie relaksacji II-rzędowych tzw. „pseudo-JG”. Pojawia się więc pytanie, *w jaki sposób można zidentyfikować molekularne pochodzenie II-rzędowych procesów relaksacyjnych?* Na podstawie dużej liczby eksperymentalnych danych dielektrycznych przedstawionych w literaturze można wnioskować, że relaksacja typu „non-JG” na widmie strat dielektrycznych występuje z reguły w postaci dobrze wyreparowanego piku o amplitudzie dużo mniejszej niż amplituda procesu α . Z kolei relaksacja typu JG, mająca pochodzenie intermolekularne, w wielu przypadkach widoczna jest jedynie jako zmiana nachylenia wysokoczęstotliwościowego skrzydła relaksacji strukturalnej. Zjawisko to, nazywane „skrzydłem nadmiarowym” (ang. *excess wing*, *EW*) widoczne jest około dwie dekady powyżej maksimum piku α .⁴⁹

Przejdźmy teraz do analizy II-rzędowych procesów relaksacyjnych badanego leku przeciwcukrzycowego. Jak pokazuje rys. 5.15a poniżej temperatury zeszklenia GCM widoczny jest dobrze wyreparowany γ – proces, który podobnie jak relaksacja strukturalna, przesuwa się w stronę niskich częstości wraz z obniżaniem temperatury. Jednak w porównaniu z pikiem α , γ wykazuje słabszą wrażliwość na zmianę temperatury.

Dynamika molekularna fazy szklistej GCM



Rys. 5.15 Panel a przedstawia widma strat dielektrycznych GCM zarejestrowane podczas ochładzania próbki w zakresie temperatur 329 – 201 K. Z kolei panel b pokazuje wynik aproksymacji γ – procesu funkcją Cole-Cole. Temperaturowa zależność czasów relaksacji γ pokazuje panel c.

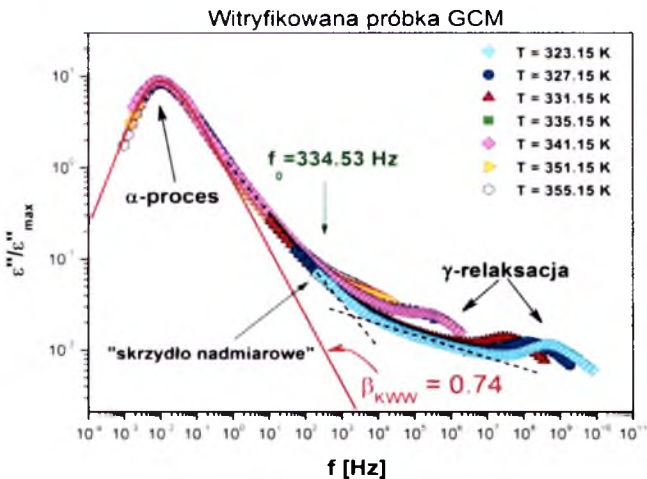
Ponieważ krzywe strat dielektrycznych relaksacji drugorzędowych przyjęto się uważać za symetryczne, w celu parametryzacji kształtu piku absorpcyjnego γ , charakteryzującego stan szklisty GCM w ciśnieniu atmosferycznym, zastosowano funkcję Cole-Cole. Jak pokazuje rys. 5.15b równanie CC bardzo dobrze opisuje dane eksperymentalne, dlatego też, w kolejnym etapie analizy, najlepsze aproksymacje widm dielektrycznych funkcją CC wykorzystano w celu precyzyjnego wyznaczenia czasów γ – relaksacji. Otrzymaną w ten sposób temperaturową zależność τ_γ przedstawia rys. 5.15c. Z uwagi na to, iż dane $\log \tau_\gamma(1/T)$ tworzą linię prostą, korzystając z prawa Arrheniusa w postaci:

$$\tau_\gamma = \tau_\infty \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad 5.1$$

gdzie τ_∞ oznacza czynnik przedwykładniczy a R stałą gazową, możemy wyznaczyć energię aktywacji E_a γ procesu w ciśnieniu atmosferycznym. Najlepsze dopasowanie funkcji do danych eksperymentalnych uzyskano dla następującego zestawu parametrów: $\log \tau_\infty = -13.92 \pm 0.98$, $E_a = 49.24 \pm 0.98$ kJ/mol. Wyznaczona, niezbyt wysoka wartość energii aktywacji γ – relaksacji sugeruje, że źródłem tego procesu może być ruch niewielkiego fragmentu molekuly GCM. W tym miejscu możemy zadać pytanie, czy γ jest jedynym II-rzędowym procesem relaksacyjnym charakteryzującym dynamikę molekularną fazy szklistej GCM?

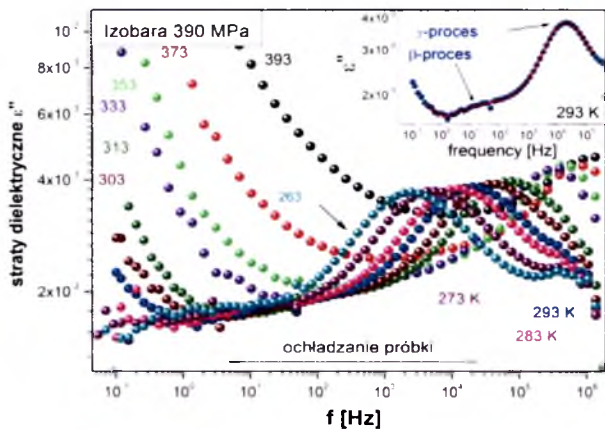
Aby sprawdzić, czy amorficzny glibenklamid cechuje się również obecnością ukrytej relaksacji typu Johari-Goldstein, w pierwszej kolejności nałożono na siebie widma strat dielektrycznych zarejestrowane zarówno powyżej jak i poniżej temperatury zeszklenia GCM.

Jak pokazuje rys. 5.16 badany lek jest kolejnym przykładem materiału, który charakteryzuje się obecnością „skrzydła nadmiarowego”. Jeżeli teraz zastosujemy model sprzężeniowy (równ. 1.6), przyjmując wcześniej ustaloną wartość parametru $\beta_{KWW} = 0.74$, oraz wartość τ_a procesu zarejestrowanego w temperaturze 341 K okazuje się, że położenie czasu relaksacji prymitywnej ($\tau_p = 4.76 \cdot 10^{-4} s$), któremu odpowiada częstotliwość $f_0 = 334.53 \text{ Hz}$, wskazuje na obszar, w którym widoczny jest EW. Wynik ten sugeruje, iż skrzydło nadmiarowe może stanowić wysokoczęstotliwościowe zbocze ukrytej relaksacji typu JG, której maksimum wskazuje częstotliwość f_0 .



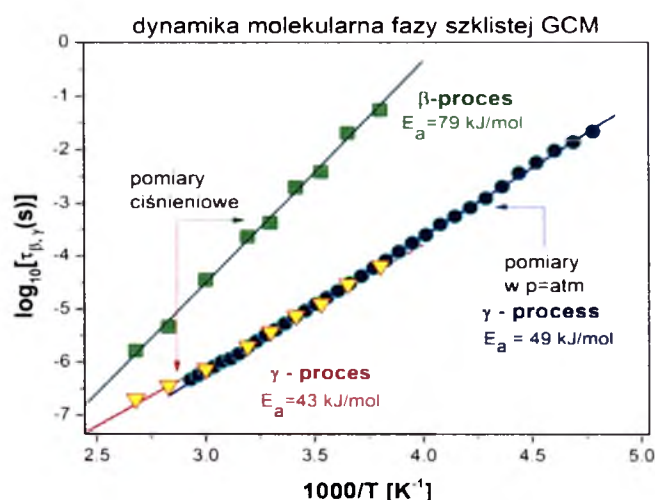
Rys. 5.16 „Masterplot” złożony z widm strat dielektrycznych zarejestrowanych w ciśnieniu atmosferycznym w siedmiu różnych temperaturach, zarówno powyżej jak i poniżej T_g . Zielona strzałka wskazuje jak i poniżej T_g . Zielona strzałka wskazuje pozycję maksimum piku ukrytej relaksacji JG wyznaczoną na podstawie modelu sprzężeniowego.

Aby zweryfikować ten pogląd wykonano badania ciśnieniowe GCM, będące obok eksperymentów starzeniowych, metodą pozwalającą wyseparować relaksację II-rzędową słabo widoczną w pomiarach atmosferycznych.¹⁰¹ Otrzymane widma strat dielektrycznych, zarejestrowane podczas ochładzania próbki, w zakresie temperatur 393 – 263 K, w ciśnieniu 390 MPa, przedstawia rys. 5.17.



Rys. 5.17 Widma strat dielektrycznych zarejestrowane w ciśnieniu $P = 390 \text{ MPa}$, w zakresie temperatur 393 – 363 K. Wstawka do rysunku przedstawia widmo zmierzone w $T = 293 \text{ K}$ aproksymowane złożeniem dwóch funkcji Cole-Cole.

Powyższy rysunek wyraźnie pokazuje, iż tak samo jak podczas pomiarów w $p = 0.1$ MPa, dominująca na widmie relaksacja γ przemieszcza się w stronę niskich częstości podczas ochładzania próbki. Jednak w odróżnieniu od eksperymentu wykonanego w warunkach ciśnienia atmosferycznego, w rejonie minimum pomiędzy procesami γ oraz α , pojawia się nowy proces relaksacyjny. Aproksymacja krzywych strat dielektrycznych przedstawionych na powyższym rysunku z użyciem funkcji będącej złożeniem dwóch równań Cole-Cole (wstawka do rys. 5.17), umożliwiła dokładne wyznaczenie czasów relaksacji obydwu procesów II-rzędowych – γ oraz nowego β , a w konsekwencji obliczenie ich energii aktywacji. Otrzymane temperaturowe zależności τ_β oraz τ_γ wraz z wyznaczonymi wartościami E_a przedstawia rys. 5.18.

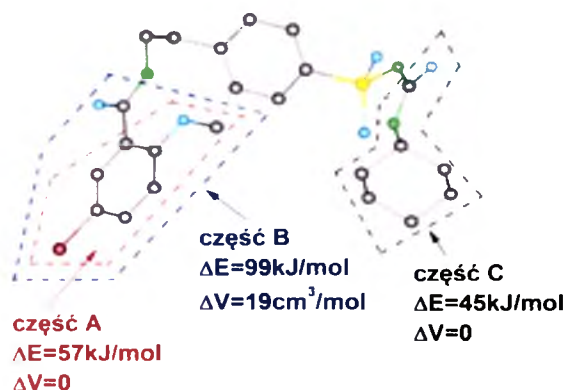


Rys. 5.18 Mapa drugorzędowych procesów relaksacyjnych GCM. Niebieskie symbole oznaczają czasy γ – relaksacji otrzymane w $P = atm$, podczas gdy zielone i żółte symbole przedstawiają odpowiednio temperaturowe zależności τ_β oraz τ_γ otrzymane w pomiarach ciśnieniowych ($P = 360$ MPas).

Jak łatwo zauważyć energia aktywacji γ – relaksacji jest praktycznie niezmienna z ciśnieniem, co sugeruje że ruch molekularny będący źródłem tego procesu nie zależy od gęstości układu. A zatem wcześniejsze sugestie o wewnątrzcząsteczkowym pochodzeniu relaksacji γ są słuszne. Z kolei drugi proces II-rzędowy, o energii aktywacji równej 79 kJ/mol, wydaje się mieć charakter relaksacji JG.

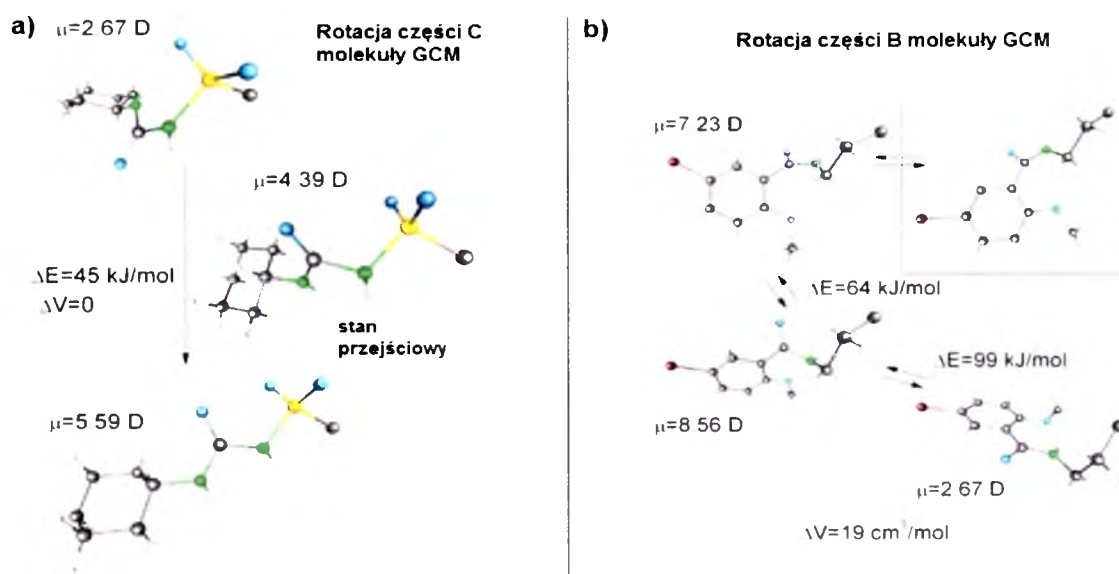
W celu ostatecznego zweryfikowania molekularnego pochodzenia II-rzędowych procesów relaksacyjnych GCM wykonano obliczenia kwantowo – mechaniczne oparte na teorii funkcyjnału gęstości (ang. *density functional theory*, DFT). W pierwszej kolejności przeprowadzono symulacje rotacji trzech fragmentów cząsteczki GCM, oznaczonych literami

A, B i C na rys. 5.19, oraz wyznaczono teoretyczne bariery energetyczne odpowiadające ruchom tych terminalnych fragmentów molekuly.¹⁰²



Rys. 5.19 Struktura cząsteczki glibenklamidu. Część A – pierścień chlorometoksyfenylowy, część B – pierścień chlorometoksyfenylowy z grupą karbonylową, część C – cykloheksyl wraz z atomem azotu i grupą karbonylową.

Jak pokazuje powyższy rysunek oszacowana teoretycznie energia aktywacji odpowiadająca rotacji części C molekuly GCM zbliżona jest do eksperymentalnej E_a γ - procesu. A zatem obrót cykloheksylowego fragmentu cząsteczki GCM może być źródłem relaksacji γ . Jedynym warunkiem takiego scenariusza jest zmiana momentu dipolowego cząsteczki podczas rotacji grupy C, ponieważ tylko takie zmiany konformacyjne są monitorowane za pomocą spektroskopii dielektrycznej. Dlatego też, w kolejnym etapie analizy oszacowano zmianę wartości momentu dipolowego $\Delta\mu$ towarzyszącą rotacji fragmentu C molekuly. Rezultat obliczeń przedstawia rys. 5.20a. Otrzymana znacząca różnica zarówno wartości jak i kierunku momentu dipolowego jednoznacznie potwierdza wcześniejsze założenie, iż rotacja fragmentu cykloheksylowego jest źródłem γ –relaksacji. Dodatkowo, warto zwrócić uwagę na fakt, iż wyznaczona teoretycznie objętość aktywacji związana z obrotem tego fragmentu molekuly jest zerowa, co wskazuje na brak wrażliwości γ – procesu na zmiany ciśnienia, co jest również zgodne z danymi eksperymentalnymi.



Rys. 5.20 Panel a przedstawia zmiany konformacyjne utożsamiane z relaksacją γ , tj. obrót pierścienia cykloheksylowego wraz z sąsiadującym atomem azotu oraz grupą karbonyłową. Natomiast panel b pokazuje zmianę konformacyjną fragmentu chlorometoksyfenylowego wraz z grupą karbonyłową utożsamianą z procesem relaksacyjnym β . Wstawka przedstawia imidowy izomer GCM.

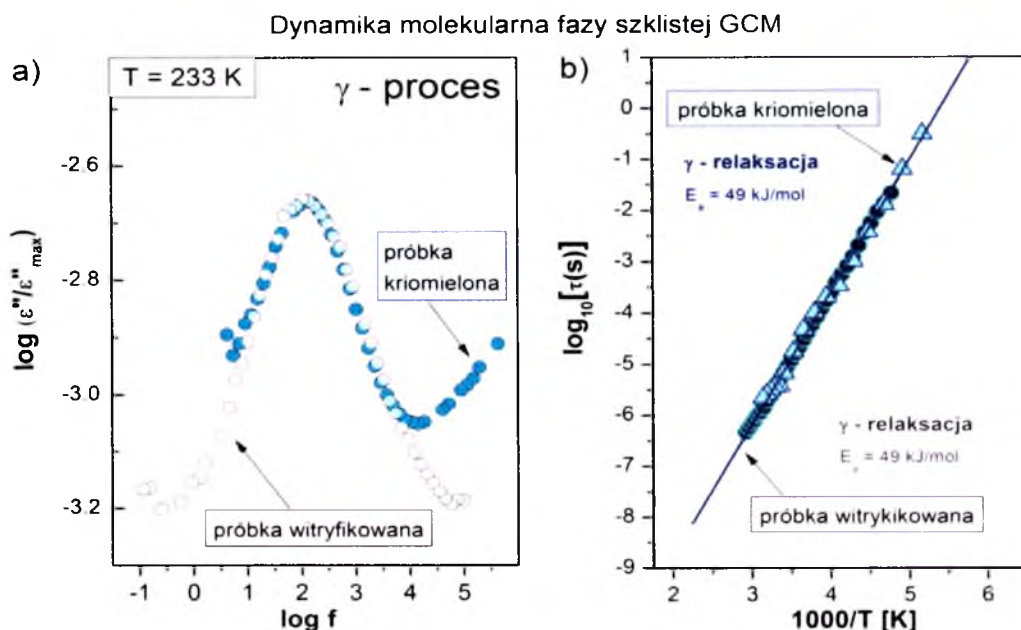
Aby wyjaśnić molekularną naturę β – relaksacji wykonano natomiast obliczenia bariery energetycznej, $\Delta\mu$ oraz objętości aktywacji towarzyszące zmianom konformacyjnym dwóch pozostałych fragmentów cząsteczki tj. A i B przedstawionych na rys. 5.19. Jak pokazuje rys. 5.20b rotacja pierścienia chlorometoksyfenylowego i grupy karbonyłowej związana jest ze znaczącą zmianą wartości momentu dipolowego cząsteczki. Ponadto zmiana konformacyjna tego typu wiąże się z dodatnią wartością objętości aktywacji równą 19 cm³/mol. Z kolei obrót samego pierścienia aromatycznego (fragment A) nie wymaga dodatkowej objętości, o czym świadczy $\Delta V=0$, a ponadto konformacyjne stany początkowy i końcowy charakteryzują się taką samą wartością momentu dipolowego. Na tej podstawie możemy wnioskować, iż jedynie rotacja pierścienia chlorometoksyfenylowego wraz z grupą karbonyłową, wrażliwa na zmiany gęstość układu, może być monitorowana za pomocą spektroskopii dielektrycznej. W konsekwencji to właśnie ten wewnątrzcząsteczkowy ruch może być źródłem relaksacji β . Jak pokazuje rys. 5.20b energia aktywacji oszacowana dla rotacji fragmentu B molekuly GCM wynosi 99 kJ/mol, czyli jest o 20 kJ/mol większa od wartości E_a wyznaczonej eksperymentalnie. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, iż rozpatrywana część cząsteczki może występować w postaci dwóch izomerów. Dlatego też, obliczono również barierę energetyczną związaną ze zmianą konformacji fragmentu B imidowego tautomeru cząsteczki GCM. Otrzyma wartość wynosi 64 kJ/mol. A zatem można

łatwo zauważyć, iż eksperymentalna $E_a \beta$ – procesu (79 kJ/mol) jest właściwie średnią arytmetyczną teoretycznie wyznaczonych wartości (81 kJ/mol). W tym miejscu warto wspomnieć, iż przedstawione powyżej obliczenia DFT wykonane zostały dla izolowanej molekuly glibenklamidu. Stąd też mogą wynikać rozbieżność między teoretycznymi i eksperymentalnymi wielkościami barier energetycznych. Nie mniej jednak, biorąc pod uwagę całokształt przedstawionych obliczeń oraz eksperymentalnych danych dielektrycznych możemy wnioskować, iż to właśnie rotacja fragmentu molekuly oznaczonego literą B jest źródłem relaksacji β . Biorąc pod uwagę, iż wspomniany ruch jest wewnątrzcząsteczkową zmianą konformacyjną wrażliwą na zmiany ciśnienia proces β możemy zaklasyfikować jako relaksację „*pseudo-JG*”.

Reasumując, możemy powiedzieć, iż dynamiką molekularną fazy szklistej badanego leku kierują dwa II-rzędowe procesy relaksacyjne: β i γ , obydwa o pochodzeniu wewnątrzcząsteczkowym. Pierwszy z nich, zaklasyfikowany jako relaksacja „*pseudo-JG*”, pochodzi od wrażliwej na zmiany ciśnienia rotacji pierścienia chlorometoksyfenylowego wraz z grupą karbonylową. Z kolei drugi, przypisany do grupy procesów „*non-JG*”, jest dielektryczną wizualizacją obrotu terminalnej grupy cykloheksylowej cząsteczki GCM.

5.2.3 Dynamika molekularna oraz fizyczna stabilność kriomielonej próbki GCM

Widma dielektryczne amorficznej próbki glibenklamidu, otrzymanej w wyniku procesu mielenia kriogenicznego, zarejestrowano podczas ogrzewania materiału w zakresie temperatur 201 – 387 K. Ze względu na fakt, iż położenia krzywych strat dielektrycznych zmierzone w niskich temperaturach nie różnią się od tych zarejestrowanych dla witrifikowanej próbki GCM, na rys. 5.21a pokazano jedynie porównanie kształtów relaksacji γ , charakteryzującej fazę szklistą obydwu materiałów.

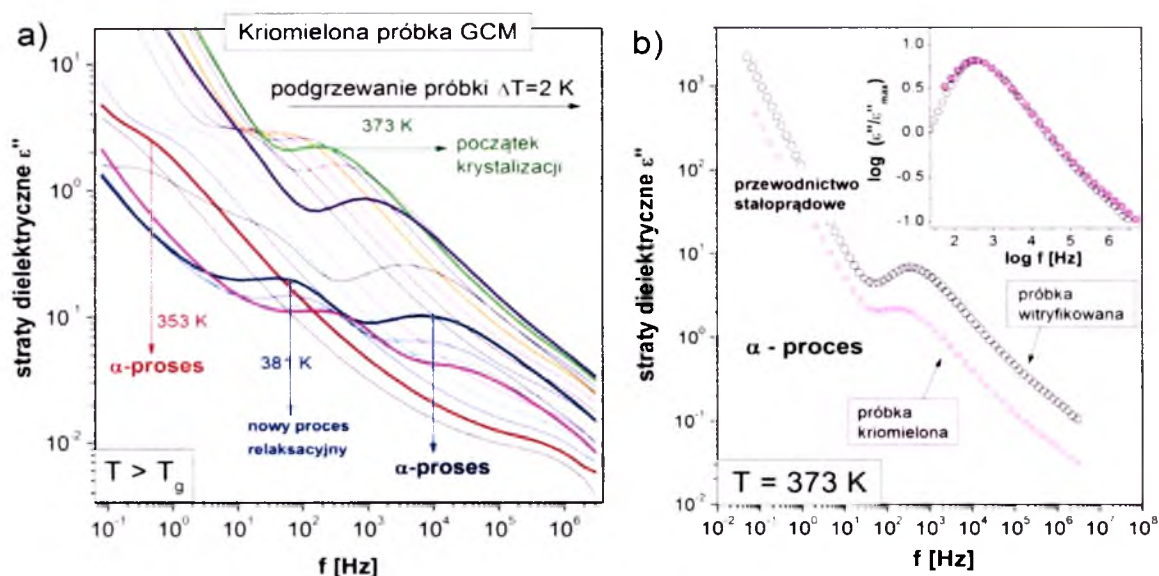


Rys. 5.21 Panel a przedstawia superpozycję krzywych strat dielektrycznych zarejestrowanych w tej samej temperaturze dla różnych próbek GCM, kriomielonej i witrifikowanej. Z kolei panel b pokazuje temperaturowe zależności czasów γ - relaksacji próbek otrzymanych dwiema różnymi metodami.

Jak łatwo zauważyć na powyższym rysunku, również kształt γ – procesu nie zależy od techniki, jaką otrzymano amorficzną próbkę. Biorąc pod uwagę powyższe fakty możemy oczekiwać, iż również wartość energii aktywacji γ – relaksacji będzie tożsama dla obydwu analizowanych materiałów. Rys. 5.21b potwierdza słuszność tego założenia. Otrzymana wartość E_a dla relaksacji γ obserwowanej na widmie próbki kriomielonej ($E_a = 49.25 \pm 0.98 \text{ kJ/mol}$) dokładnie zgadza się tą wyznaczoną dla materiału przygotowanego metodą izobarycznego schładzania cieczy. Wyniki powyższej analizy jednoznacznie sugerują, iż II-rzędowa relaksacja γ , obecna na widmie próbki otrzymanej metodą mielenia kriogenicznego, ma to samo molekularne pochodzenie co γ - proces witrifikowanego GCM.

Ze wzrostem temperatury maksimum pik relaksacji γ przesuną się w stronę wysokich częstotliwości. W zamian w oknie pomiarowym pojawia się proces relaksacji strukturalnej α . Rys. 5.22a przedstawia urojoną część zespolonej przenikalności dielektrycznej w funkcji częstotliwości zmierzoną powyżej temperatury zeszklenia badanej próbki. Już na pierwszy rzut oka przedstawione dane eksperymentalne różnią się od tych zarejestrowanych dla witrifikowanego GCM (rys. 5.9). Po pierwsze widma strat dielektrycznych charakteryzują się znacznie większym wkładem przewodnictwa stałoprądowego, co nieznacznie utrudnia dokładną identyfikację maksimum pik $\epsilon''(f)$. Jednak

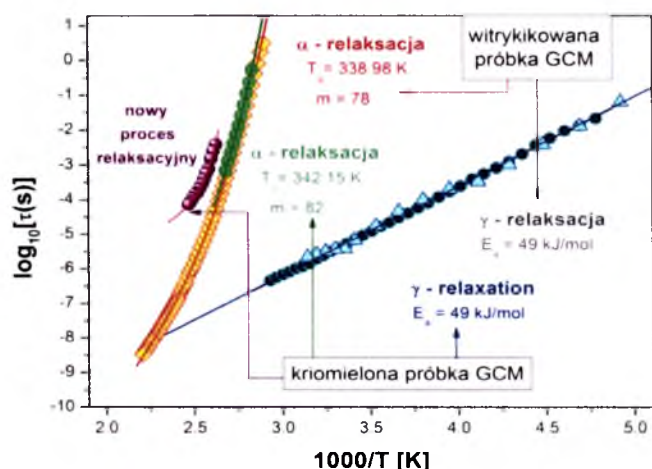
co ważniejsze, w temperaturze nieco przewyższającej 373 K obserwujemy wyraźny spadek intensywności pików relaksacji strukturalnej związany z tzw. zjawiskiem „zimnej krystalizacji”, czyli powrotem amorficznego materiału do fazy krystalicznej. Ponadto w miarę wzrostu temperatury spadek siły dielektrycznej $\Delta\epsilon$ widma jest coraz to większy, co wynika z rosnącej ilości regionów krystalicznych. Z kolei w finalnym etapie procesu krystalizacji na widmie strat dielektrycznych, oprócz α procesu, pojawia się dodatkowy pik relaksacyjny, którego pochodzenie nie zostało jednak dokładnie wyjaśnione. Prawdopodobnie związany jest on z mechanizmem krystalizacji badanej substancji.



Rys. 5.22 Panel a: widma strat dielektrycznych kriemielonej próbki GCM zarejestrowane w czasie pomiarów izobarycznych w ciśnieniu atmosferycznym, w zakresie temperatur 351–385 K. Panel b: porównanie położenia oraz kształtu (wstawka do rysunku) krzywych strat dielektrycznych zarejestrowanych w tej samej temperaturze dla dwóch różnych próbek GCM, kriemielonej i witrifikowanej.

W kolejnym etapie analizy widm dielektrycznych porównano położenie i kształt procesu relaksacji strukturalnej, zarejestrowanego w $T = 373$ K, dla próbek amorfizowanych technikami mielenia oraz izobarycznego schładzania cieczy. Otrzymany wynik przedstawia rys. 5.22b. Podczas gdy kształt krzywej absorpcji pozostaje niezmienny, maksimum pików ϵ'' kriemielonej próbki jest nieznacznie przesunięte w stronę niższych częstotliwości. Sugeruje to nieco wyższą wartość temperatury zeszklenia mielonego GCM. Aby potwierdzić tę tezę, w pierwszej kolejności, stosując aproksymacje wszystkich danych eksperymentalnych przedstawionych na rys. 5.22a funkcją HN, wyznaczono czasy relaksacji τ_a , które przedstawiono w funkcji temperatury na rys. 5.23. Następnie, podobnie jak w przypadku

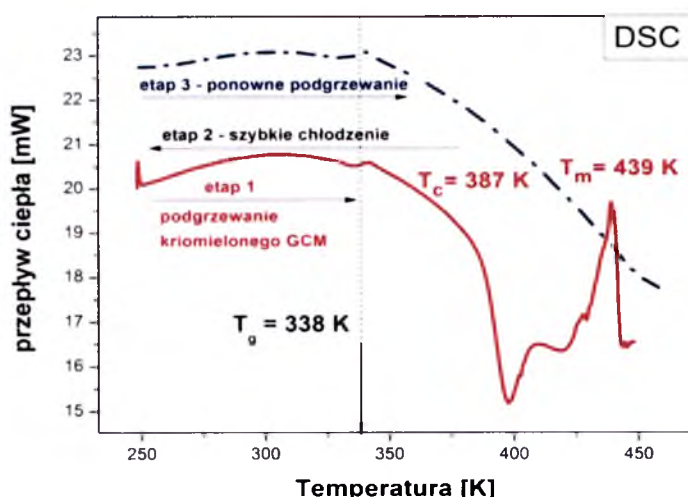
witryfikowanego GCM, zależność $\tau_a(T^{-1})$ opisano za pomocą równania VFT (równ. 1.1). Najlepsze dopasowanie funkcji do danych eksperymentalnych uzyskano dla następującego zestawu parametrów: $\log t_{\infty} = -14.71 \pm 0.68$, $D_1 = 9.86 \pm 1.2$, $T_0 = 272 \pm 4$ K. Tego typu działanie umożliwiło wyznaczenie parametrów charakteryzujących amorficzny kriomielony materiał, czyli jego temperaturę przejścia szklistego $T_g = 342$ K ($\tau_a = 100$ s) oraz parametr kruchości dynamicznej $m_p = 82$. Co ciekawe otrzymana wartość T_g jest bardzo zbliżona do tej wyznaczonej w pracy [92] dla próbki GCM otrzymanej metodą mielenia w temperaturze pokojowej ($T_g = 343$ K). Jeśli natomiast porównamy T_g próbek kriomielonej i witryfikowanych (próbki 1 i 2 na rys. 5.13) uzyskujemy zgodność jedynie z materiałem, w którym ustaliła się równowaga między tautomerami, tj. próbką o mniejszej koncentracji imidów.



Rys. 5.23 Kompletna mapa relaksacyjna próbek GCM, witryfikowanej oraz utrzymywanej metodą mielenia kriogenicznego.

Ponadto, przytaczając założenie przedstawione w poprzedniej części pracy (paragraf 5.2.1), zgodnie z którym rosnący parametr kruchości m_p odzwierciedla malejącą ilość imidowych izomerów w próbce GCM, a jednocześnie świadczy o rosnącej tendencji układu do rekrytalizacji, możemy przypuszczać, iż badany kriomielony materiał charakteryzuje niewielki procentowy udział mało stabilnych tautomerów oraz największa niestabilność fizyczna spośród wszystkich badanych próbek GCM. Założenia te są spójne z danymi zamieszczonymi w paragrafie 5.1.1, gdzie oszacowano ilość form imidowych w kriomielonej próbce GCM na nieco ponad 5%, oraz danymi dielektrycznymi, które jednoznacznie sugerują rekrytalizację amorficznego materiału podczas ogrzewania powyżej 373 K.

Aby zweryfikować informacje na temat fizycznej niestabilności kriomielonej próbki GCM otrzymane w badaniach dielektrycznych, wykorzystując technikę DSC, zbadano efekty cieplne towarzyszące ogrzewaniu badanego materiału. Uzyskany termogram DSC przedstawia rys. 5.24.



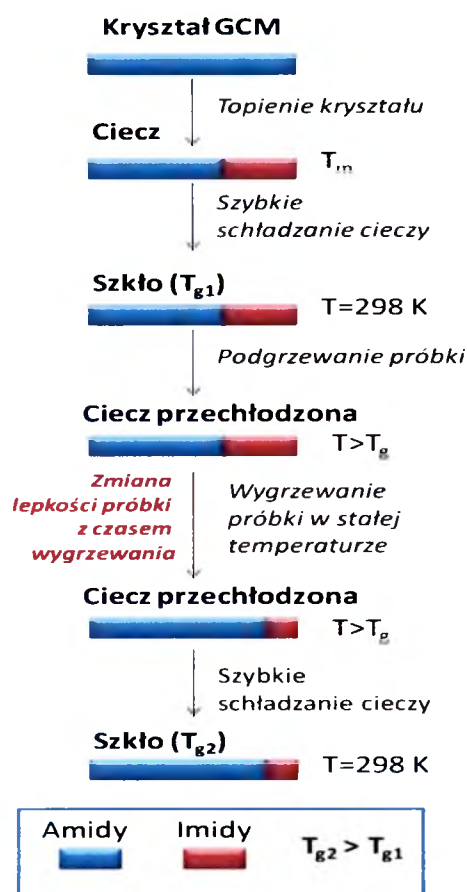
Rys. 5.24 Termogram DSC otrzymany podczas podgrzewania kriomielonej próbki GCM (czerwona linia ciągła) oraz kriomielonego materiału poddanego procesowi witrifikacji (niebieska linia przerywana).

W pierwszej kolejności obserwujemy efekt endotermiczny związany z przejściem szklistym badanej substancji ($T_{gDSC}=338\text{ K}$), a następnie egzotermiczny pik w zakresie temperatur $383 - 413\text{ K}$ świadczący o rekrytalizacji układu. Otrzymana krystaliczna forma GCM topi się w temperaturze 439 K . Jak pokazuje rys. 5.24 w wyniku szybkiego ochłodzenia stopionego materiału otrzymujemy witrifikowane szkło GCM, o tej samej wartości T_g co próbka kriomielona, ale nie wykazujące żadnej tendencji do rekrytalizacji. Z zatem różnice w stabilności amorficznych próbek GCM przygotowanych różnymi technikami wydają się oczywiste. Jednak w tym miejscu warto nadmienić, iż te same próbki przechowywane w temperaturze pokojowej oraz warunkach ograniczonej wilgotności (10%) nie wykazują żadnej tendencji do rekrytalizacji. Badania z wykorzystaniem techniki dyfrakcji rentgenowskiej wykonane 3 lata po kriomieleniu i witrifikacji nadal pokazują szerokie halo charakterystyczne dla amorficznego materiału. A zatem jeden z warunków jaki musi być spełniony, aby móc wprowadzić na rynek amorficzną postać leku, a mianowicie jego fizyczna trwałość przez co najmniej 3 lata, w przypadku GCM został spełniony.

5.3 Kinetyka reakcji tautomeryzacji GCM

Ponieważ w ostatnich latach produkcja stałych form leków, w których substancja lecznicza występuje w formie amorficznej, a nie krystalicznej, stanowi jedno z ważniejszych zadań, jakie stawia przed sobą nowoczesny przemysł farmaceutyczny, badania tautomeryzacji układów nie posiadających dalekozasięgowego uporządkowania mają coraz to większe znaczenie w farmakologii. Dzieje się tak przede wszystkim dlatego, iż zjawisko izomeryzacji może mieć zarówno pozytywne jak i negatywne skutki. Z jednej strony występowanie tautomerów może zwiększać rozpuszczalność i biodostępność leku, a także przeciwdziałać jego rekrytalizacji, co stanowi olbrzymi atut w przypadku leków amorficznych. Równocześnie jednak tworzące się izomery posiadające wielokrotnie odmienne własności fizyczno-chemiczne takie jak moment dipolowy, temperatura zeszklenia czy współczynnik refrakcji, mogą posiadać inną aktywność biologiczną. W konsekwencji powstaje lek, którego działanie może różnić się od oczekiwanego, a co gorsza nieaktywne formy mogą dawać niepożądane skutki uboczne. Przykładem może być powszechnie stosowany antybiotyk - erytromycyna. Związek ten może występować w postaci trzech izomerów, przy czym tylko jeden z nich wykazuje aktywność bakteriobójczą.¹⁰³ Pojawiają się więc fundamentalne pytania: *czy można kontrolować zjawisko tautomeryzacji? oraz czy można mu przeciwdziałać, jeśli transformacja leku okazałaby się niekorzystna dla pacjenta?* Jednak aby rozwiązać ten problem w pierwszej kolejności konieczne jest wykonanie dokładnej fizykochemicznej analizy tautomeryzujących układów. Dlatego też, w kolejnej części niniejszej pracy skoncentrowano się na badaniach kinetyki reakcji tautomeryzacji glibenklamidu w różnych warunkach termicznych. W tym miejscu warto nadmienić, iż planowana analiza kinetyki reakcji transferu protonu w materii skondensowanej stanowi jak dotąd nieeksplorowany kierunek badań.

5.3.1 Badania z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej

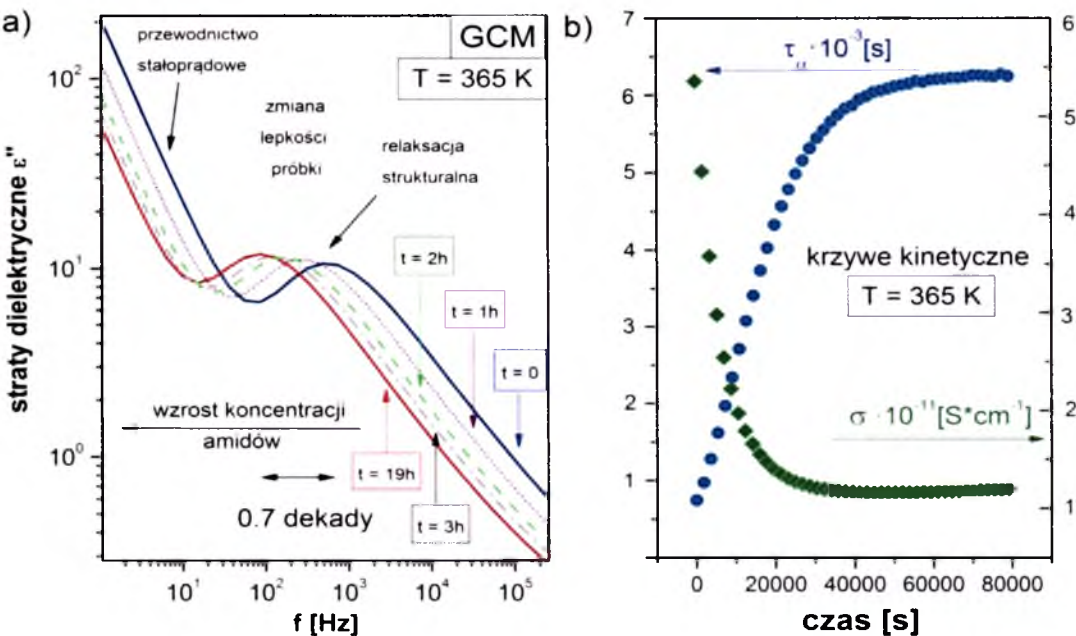


Rys. 5.25 Schemat przedstawiający zmianę koncentracji form amidowych i imidowych między kryształem, cieczą przechłodzoną i szkłem.

Jak pokazano w poprzedniej części pracy, wewnątrzcząsteczkowa reakcja transferu protonu rozpoczyna się w momencie topienia krystalicznej próbki GCM. Wtedy to amidowe izomery obecne w kryształach ulegają transformacji do mniej stabilnych form imidowych. W wyniku szybkiego przechłodzenia układu otrzymujemy amorficzną próbkę GCM, o temperaturze zeszklenia równej 327 K , którą charakteryzuje ustalona w T_m równowaga amidowo - imidowa. Jeśli otrzymany materiał będzie następnie wygrzewany przez odpowiednio długi czas w temperaturze przewyższającej T_g osiągnięta wcześniej proporcja izomerów zmieni się. Ustali się nowa równowaga, o większej populacji form amidowych, a otrzymaną próbkę GCM będzie charakteryzowała wyższa wartość temperatury zeszklenia (338 K) (Rys. 5.25).¹⁰⁴ Z uwagi na to, iż procesowi dochodzenia układu do stanu równowagi chemicznej towarzyszy zmiana lepkości próbki, doskonałym narzędziem umożliwiającym monitorowanie transferu protonu w fazie skondensowanej GCM wydaje się być spektroskopia dielektryczna.

W celu badania zjawiska tautomeryzacji GCM, przy pomocy techniki BDS, przygotowano pięć witryfikowanych próbek leku, które następnie poddano czasowym pomiarom dielektrycznym w stałych temperaturach ($T > T_g$). Co istotne, każdą z próbek wygrzewano w innych warunkach izotermicznych. Przykładowy wynik pomiaru, w postaci ewoluujących w czasie krzywych strat dielektrycznych, przedstawia rys. 5.26a. Jak łatwo zauważyć, z czasem położenie pików relaksacji strukturalnej przesuwają się w stronę niskich częstotliwości, co świadczy o rosnącej lepkości próbki, której towarzyszy spadek koncentracji form imidowych GCM. Ponadto warto zaznaczyć, iż czas potrzebny do osiągnięcia stanu

równowagi jest bardzo długi, w $T = 365\text{ K}$ wynosi aż 19 godzin. Co więcej, proces ten wydłuża się wraz z obniżaniem temperatury.



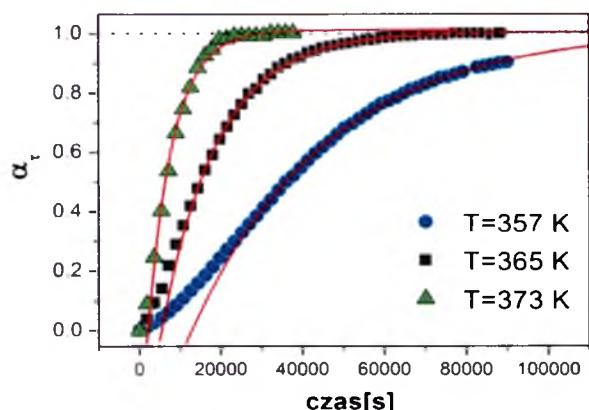
Rys. 5.26 Panel (a): Widma strat dielektrycznych GCM zarejestrowane w izotermicznym pomiarze czasowym. Panel (b): Ewolucja czasowa czasu relaksacji strukturalnej (niebieskie symbole) oraz przewodnictwa stałoprądowego (zielone symbole) w temperaturze 365 K.

Aby opisać kinetykę reakcji tautomeryzacji GCM w różnych warunkach termicznych niezbędna jest analiza ewolucji czasowej jednej z dwóch wielkości fizycznych: czasu relaksacji strukturalnej, odpowiadającego maksimum piku α , $\tau_\alpha = 1/2\pi f_{\text{max}}$ lub wartości przewodnictwa stałoprądowego σ . W celu wyznaczenia obydwu tych parametrów wykorzystano standardową procedurę aproksymacji krzywych $\epsilon''(f)$ funkcją HN. Otrzymany wynik, w postaci zależności $\tau_\alpha(t)$ oraz $\sigma(t)$ przedstawia rys. 6.26b. Ponieważ powstałe krzywe opisują postęp reakcji transferu protonu, tj. stopień zaawansowania zjawiska, możemy nazwać je krzywymi kinetycznymi procesu tautomeryzacji.

Zc względu na to, iż każdej izotermicznej reakcji towarzyszy inna zmiana lepkości próbki, aby móc przedstawić ewolucję czasową τ_α dla wszystkich wykonanych pomiarów na jednym wykresie obliczono tzw. stopień reakcji α , definiowany jako:¹⁰⁵

$$\alpha = \frac{\tau - \tau_p}{\tau_k - \tau_p} \tag{5.2}$$

gdzie: τ_p oznacza czas relaksacji odpowiadający maksimum pierwszej zmierzonej krzywej absorpcyjnej. Z kolei τ_k to czas relaksacji charakteryzujący próbkę o ustalonej równowadze amidowo - imidowej. Zatem parametr α można uznać za stopień konwersji form imidowych GCM do amidowych. Znormalizowane krzywe kinetyczne otrzymane na podstawie badań ewolucji czasowej τ_α dla trzech wybranych pomiarów izotermicznych przedstawia rys. 5.27.



Rys. 5.27 Trzy przykładowe znormalizowane krzywe kinetyczne skonstruowane na podstawie ewolucji czasowej τ_α aproksymowane równaniem kinetycznym pierwszego rzędu (równ. 5.3).

Jak łatwo zauważyć otrzymane krzywe kinetyczne opisujące reakcję transferu protonu w fazie skondensowanej GCM mają w większości charakter eksponencjalny. A zatem można je sparametryzować równaniem kinetycznym pierwszego rzędu:¹⁰⁶

$$\alpha = 1 - A \cdot \exp(-kt) + C \quad 5.3$$

gdzie α oznacza stopień reakcji, t – czas, A jest czynnikiem przedwykładniczy, natomiast k to stała szybkości reakcji, jeden z najważniejszych parametrów opisujących kinetykę reakcji chemicznych. Przykładowe aproksymacje danych eksperymentalnych równaniem 5.3 przedstawia rys. 5.27. Już na pierwszy rzut oka widać, że w przypadku krzywej kinetycznej zarejestrowanej w najniższej temperaturze parametryzacja danych eksperymentalnych nie jest dokładna. W tym przypadku formuła 5.3 nie opisuje początkowej fazy reakcji tautomerizacji. Co ciekawe, sigmoidalny charakter zależności $\tau_\alpha(t)$ można zaobserwować jedynie w przypadku eksperymentów przeprowadzonych w wąskim zakresie temperatur 357 - 365 K, w pobliżu przejścia szklistego GCM. A zatem, jedynie w temperaturach bliskich T_g reakcja transferu protonu przebiega na tyle wolno, że można obserwować jej początkowe stadium. Z kolei wraz ze wzrostem temperatury efekt ten zostaje zatracony. Nasuwa się więc pytanie, o czym świadczy sigmoidalny charakter krzywych kinetycznych? Jedną z możliwości jest autokatalityczny przebieg reakcji, inną zaś założenie, że mamy do czynienia z serią reakcji następnych. Druga z przedstawionych teorii została wykorzystana do wyjaśnienia podobnego przebiegu krzywych kinetycznych opisujących proces mutarotacji D-fruktozy.¹⁰⁷ Jednak

warto zwrócić uwagę na fakt, że proces mutarotacji monosacharydów jest o wiele bardziej skomplikowany niż reakcja transferu protonu w GCM. Dlatego też, możemy przypuszczać, że pierwsza, szybka faza procesu tautomeryzacji GCM może obejmować jedynie zmiany konformacyjne molekuły konieczne do przeskoku protonu.

W kolejnym etapie badań kinetyki reakcji tautomeryzacji GCM, wartości stałych szybkości reakcji, wyznaczone jako parametr dopasowania funkcji eksponencjalnej do każdej z analizowanych krzywych kinetycznych, wykorzystano do obliczenia czasu połowicznej reakcji transferu protonu w różnych warunkach termicznych:

$$t_{1/2} = \ln(2) / k$$

5.4

Otrzymane wyniki przedstawione zostały w tabeli 5.4.

Tabela 5.4 Parametry charakteryzujące kinetykę reakcji transferu protonu GCM w różnych warunkach termicznych.

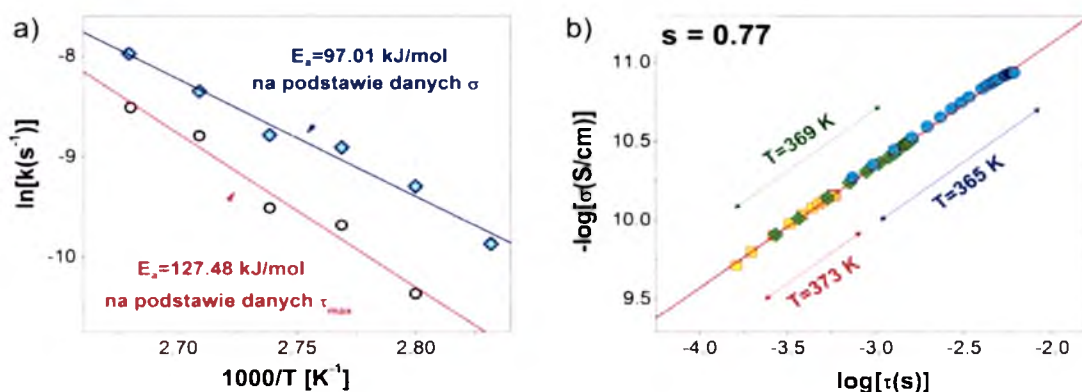
Temperatura [K]	Stała szybkości reakcji k [s ⁻¹]	Czas połowicznej przemiany [min]	Zmiana położenia maksimum pików α [decade]
373	2.0148 · 10 ⁻⁴	57.33	0.37
369	1.524 · 10 ⁻⁴	75.79	0.71
365	7.167 · 10 ⁻⁴	161.17	0.82
361	6.249 · 10 ⁻⁵	184.85	0.86
357	3.155 · 10 ⁻⁵	366.13	1.1

Wykorzystując wartości stałych szybkości reakcji wyznaczone eksperymentalnie, możemy oszacować czas połowicznej przemiany amidów w imidy w temperaturze pokojowej. Wynosi on niespełna 3 lata. A zatem możemy oczekiwać, że w tej temperaturze układ będzie dążył do osiągnięcia równowagi przez ponad 5 lat. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, mówiące o zmniejszonej tendencji do rekrytalizacji amorficznych układów binarnych, możemy zakładać, że w szklista postać GCM nie powinna wykazywać oznak niestabilności fizycznej minimum przez 5 lat. Wyniki tego typu badań są niezwykle istotne szczególnie z farmaceutycznego punktu widzenia, ponieważ umożliwiają dokładne zdefiniowanie warunków przechowywania amorficznego GCM. W tym miejscu warto również zwrócić uwagę na fakt, że amorficzny GCM przechowywany w różnych warunkach termicznych będzie charakteryzował się odmienną koncentracją tautomerów, a co za tym idzie może wykazywać odmienną biodostępność, a nawet działanie. Dlatego też, niezbędna jest analiza biologicznego znaczenia reakcji tautomeryzacji. Tego typu rozważania przedstawione zostaną w kolejnej części pracy.

Kontynuując opis kinetyki reakcji tautomeryzacji badanego leku przeciwcukrzycowego wykonano obliczenia energii aktywacji konwersji imid - amid. Jak pokazuje rys. 5.28a zależność $\ln k = f(1/T)$ jest liniowa. A zatem barierę energetyczną procesu izomeryzacji można oszacować jako parametr dopasowania równania Arrheniusa w postaci:¹⁰⁶

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad 5.5$$

do danych eksperymentalnych. W przypadku, gdy aproksymowano punkty otrzymane na podstawie zmian τ_a w czasie otrzymana wartość E_a wyniosła 127 kJ/mol. Z kolei, jeśli do oszacowania stałej szybkości reakcji k wykorzystano czasową zależność przewodnictwa otrzymano niższą barierę energetyczną $E_a = 97$ kJ/mol.



Rys. 5.28 Panel a: Temperaturowe zależności stałych szybkości reakcji wyznaczonych na podstawie analizy czasowych zmian czasu relaksacji strukturalnej τ_a oraz przewodnictwa σ . Panel b: Wykres zależności $\tau(\sigma)$ w skali podwójnie logarytmicznej.

Nasuwa się więc pytanie, skąd wynika różnica w wartościach E_a pomiędzy dwiema różnymi analizami tych samych eksperymentalnych danych dielektrycznych? Aby rozwiązać ten problem, na początek warto przypomnieć zależność jaka łączy czas relaksacji strukturalnej oraz przewodnictwo stałoprądowe próbki. Korelacja między tymi dwiema wielkościami fizycznymi jest bardzo często dyskutowana w kontekście relacji Debye'a – Stokesa - Einsteina (DSE):¹⁰⁸

$$\sigma\tau \cong const \quad 5.6$$

Jednak okazuje się, że istnieje cały szereg danych eksperymentalnych nie spełniający tej zależności. Obserwacje te skłoniły do wyprowadzenia równania, które w prawidłowy sposób opisywałoby relacje pomiędzy przewodnictwem a czasem relaksacji. Nowa zależność w postaci:¹⁰⁹

$$\sigma\tau^s \cong \text{const} \quad 5.7$$

powstała poprzez wprowadzenie do równania DSE wykładnika potęgowego, nazwana została ułamkowym równaniem Debye’a - Stokesa – Einsteina (ang. „fractional Debye - Stokes - Einstein”) w skrócie FDSE. Występujący w nim wykładnik „s” jest otrzymywany z eksperymentu i z reguły przyjmuje wartości mniejsze od 1.

Poprzez analogię do równania 5.7 można zaproponować zależność łączącą ze sobą stałe szybkości reakcji otrzymane na podstawie analizy krzywych $\tau_a(t)$ oraz $\sigma(t)$:

$$k_\sigma k_\tau^s \cong \text{const} \quad 5.8$$

Różniczkując powyższe równanie otrzymujemy następującą relację:

$$-R \frac{\partial \ln k_\sigma}{\partial (1/T)} + sR \frac{\partial \ln k_\tau}{\partial (1/T)} = 0 \quad 5.9$$

Ponieważ temperaturowa zależność stałej szybkości reakcji może być z łatwością powiązana z energią aktywacji analizowanego procesu:

$$E_a = -R \left. \frac{\partial \ln k}{\partial (1/T)} \right|_p \quad 5.10$$

otrzymujemy następującą zależność:

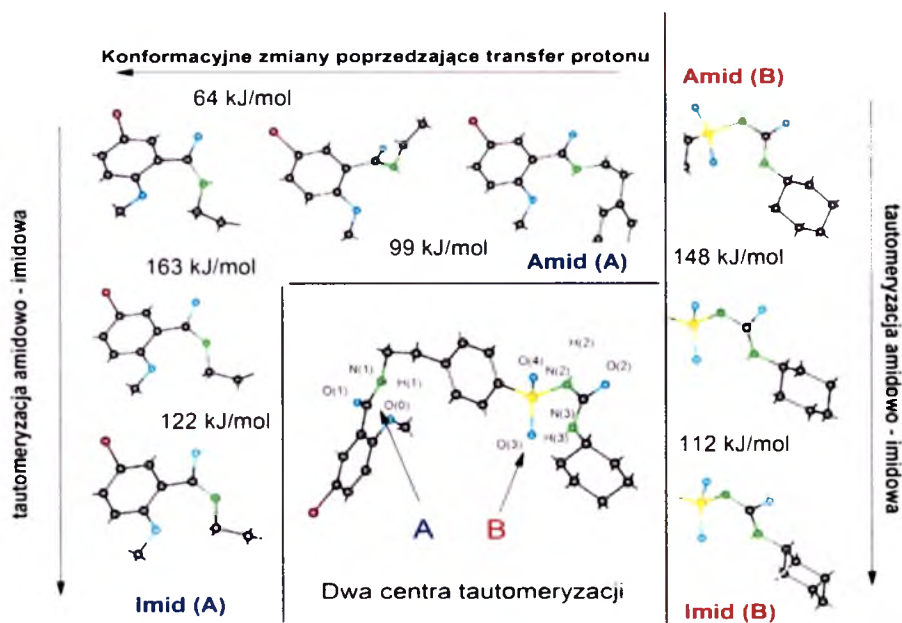
$$E_{a(\sigma)} = sE_{a(\tau)} \quad 5.11$$

Aby przetestować tą nową relację w pierwszej kolejności wyznaczono wykładnik s równania 5.7, wiążący wartości czasów relaksacji oraz przewodnictwa. W tym celu korzystając z danych zarejestrowanych w trzech wybranych pomiarach izotermicznych przygotowano wykres zależności $\log \tau = f(-\log \sigma)$. Jak pokazuje rys. 5.28b wszystkie dane eksperymentalne tworzą jedną linię, której nachylenie równe jest współczynnikowi $s = 0.77$. A zatem, w przypadku GCM, nowo wyprowadzona relacja łącząca energię aktywacji i parametr s, jest spełniona. W konsekwencji różnica między wartościami energii aktywacji jest spowodowana zjawiskiem *decouplingu* pomiędzy przewodnictwem a relaksacją strukturalną.

Wartości barier energetycznych zbliżone do tych wyznaczonych w opisanym powyżej eksperymencie dielektrycznym uzyskano również w obliczeniach kwantowo – mechanicznych opartych na teorii DFT. Szczegóły obliczeń przedstawione zostały w artykule [tauto], natomiast ich wyniki przedstawia rys. 5.29.

Badania przedstawione w niniejszym podrozdziale pokazują, że oprócz analizy ruchliwości molekularnej substancji szklitych technika spektroskopii dielektrycznej umożliwia również detekcję i monitoring kinetyki reakcji tautomerizacji. Pokazano, że

śledząc zmiany czasów relaksacji strukturalnej próbki jesteśmy w stanie monitorować przebieg transformacji pomiędzy tautomerami. W ten sposób, skomplikowane do tej pory badania procesu równowagowania w ciele stałym, polegające na określeniu skali czasowej zjawiska w różnych warunkach termodynamicznych oraz energii aktywacji reakcji tautomerizacji, stały się możliwe.

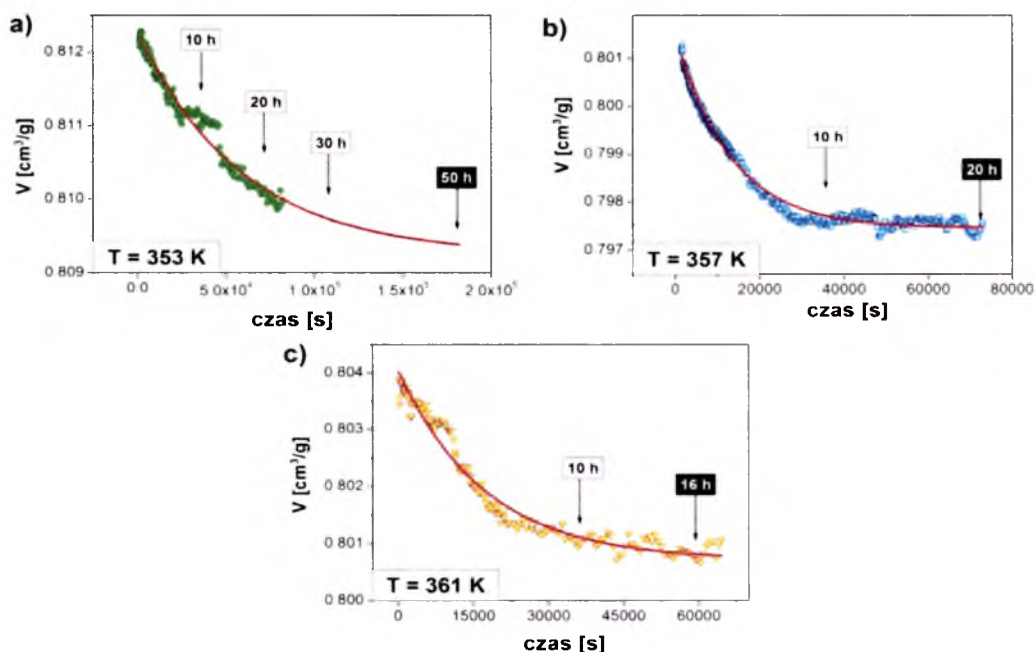


Rys. 5.29 Dwie możliwe ścieżki tautomerizacji: A – od strony pierścienia chlorometoksyfenylowego, B – w grupie sulfonylomocznikowej.

5.3.2 Analiza z zastosowaniem techniki PVT

Jak pokazano w poprzednim podrozdziale niniejszej pracy reakcja transferu protonu pomiędzy imidowymi i amidowymi izomerami GCM skutkuje zmianą temperatury zeszklenia próbki. A zatem możemy oczekiwać, że proces tautomerizacji możemy także monitorować wykonując pomiary dylatometryczne.¹¹⁰ Dlatego też, we współpracy z Instytutem Polimerów w Dreźnie, wykonano czasowe pomiary objętości właściwej próbki GCM. Tego typu badania umożliwią nam odpowiedź na pytanie, czy *technika PVT (ang. pressure-temperature-volume)*, podobnie jak *spektroskopia dielektryczna*, umożliwia badanie kinetyki reakcji izomeryzacji? A jeśli tak, to czy parametry opisujące ten proces są tożsame w przypadku obydwu wspomnianych metod eksperymentalnych?

Wykonane izotermiczne, czasowe pomiary objętości właściwej amorficznych próbek GCM przedstawia rys. 5.30.



Rys. 5.30 Zmiany objętości właściwej próbki GCM zarejestrowane podczas izotermicznych pomiarów czasowych. Linie ciągłe przedstawiają aproksymacje danych eksperymentalnych funkcją eksponencjalną.

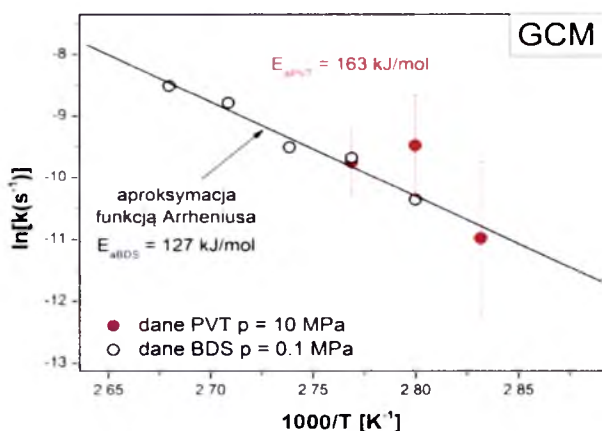
Otrzymane wyniki jednoznacznie pokazują, iż konwersji imid – amid towarzyszy nie tylko wzrost wartości T_g próbki, ale również spadek objętości właściwej (tożsamy ze wzrostem gęstości) o około 0.25-0.5% początkowej wartości. Ta raczej subtelna zmiana wynika najprawdopodobniej z faktu, że w czasie trwania pomiaru zaledwie kilka procent izomerów imidowych ulega transformacji do amidów.

Kolejnym aspektem jaki należy rozpatrzyć analizując powyższe dane PVT jest skala czasowa zjawiska tautomerizacji. Jak zostało powiedziane w poprzedniej części pracy reakcja transferu protonu jest aktywowana termicznie. A zatem czas potrzebny na osiągnięcie przez próbkę stanu równowagi powinien wydłużać się wraz z obniżaniem temperatury. Jak pokazują dane eksperymentalne przedstawione powyżej założenie to zostało spełnione. Ponieważ krzywe kinetyczne przedstawione na rys. 5.30 wykazują eksponencjalny charakter, w następnym kroku analizy, stosując parametryzację danych równaniem zbliżonym do 5.3:¹¹⁰

$$V = A \cdot \exp(-kt) + V_0 \quad 5.12$$

dla wszystkich trzech izotermicznych pomiarów czasowych wyznaczono wartości stałej szybkości reakcji k , które następnie wykreślono w funkcji temperatury. Dane przedstawione

zostały na rys. 5.31. Jak łatwo zauważyć w dwóch spośród trzech pomiarów uzyskano dobrą zgodność z danymi dielektrycznymi. Z kolei w trzecim przypadku stała k_{PVT} jest około dwukrotnie większa od k_{BDS} . Prawdopodobnie z tego powodu wartość energii aktywacji reakcji tautomerizacji oszacowana na podstawie danych wolumetrycznych (163 ± 23 kJ/mol) jest nieco większa niż ta uzyskana w pomiarach metodą spektroskopii dielektrycznej (127 ± 5 kJ/mol).



Rys. 5.31 Temperaturowe zależności stałych szybkości reakcji tautomerizacji wyznaczone przy użyciu metod spektroskopowych oraz wolumetrycznych.

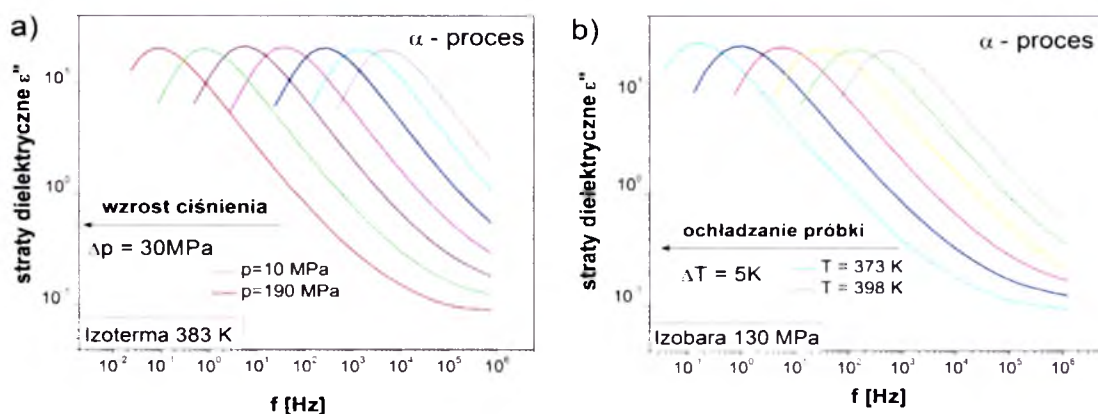
Reasumując wyniki przedstawione powyżej możemy powiedzieć, że izotermiczne pomiary wolumetryczne mogą być wykorzystywane do monitorowania reakcji tautomerizacji. Umożliwiają one nie tylko wyznaczenie podstawowych parametrów opisujących kinetykę transferu protonu, takich jak stała szybkości reakcji czy energia aktywacji procesu, ale także oszacowanie zmian gęstości próbki jakie towarzyszą konwersji między izomerami.

5.4 Wpływ wysokiego ciśnienia na dynamikę molekularną GCM

Chociaż izobaryczne przechłodzenie cieczy jest jedną z najczęściej stosowanych metod otrzymywania fazy szklistej, nie oznacza to że jest to sposób jedyny. Alternatywną metodą jest zmniejszenie objętości swobodnej próbki wskutek wywierania ciśnienia hydrostatycznego na układzie molekuł w warunkach izotermicznych. Mimo, że obie metody prowadzą do tego samego efektu końcowego, jakim jest szkło, nie są one jednak ekwiwalentne, ponieważ obniżając temperaturę zmieniamy przede wszystkim energię kinetyczną cząstek, natomiast poprzez zwiększanie ciśnienia oddziałujemy na ich energię potencjalną. Jednak z uwagi na dużą liczbę trudności eksperymentalnych w prowadzeniu wysokociśnieniowych pomiarów spektroskopowych ścieżka ta jest o wiele rzadziej eksplorowana, niż tradycyjna witrifikacja. Niemniej jednak tego typu eksperymenty są

niezbędne do kompletnego fizycznego opisu zjawiska formowania fazy szklistej.¹¹¹ Dlatego też, w niniejszym podrozdziale przedstawione zostaną badania dynamiki molekularnej glibenklamidu w warunkach wysokiego ciśnienia.

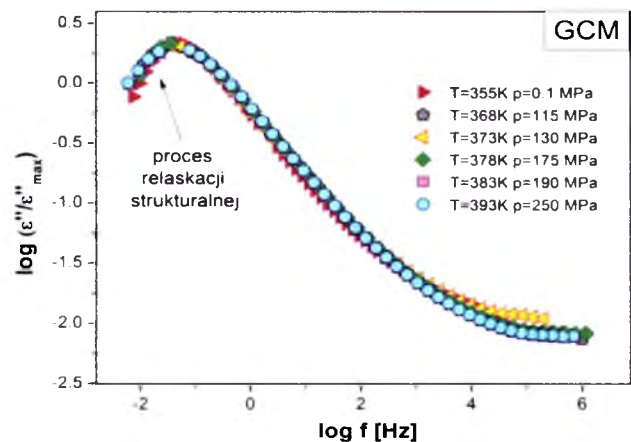
Wykonane eksperymenty obejmują serię zarówno izotermicznych jak i izobarycznych pomiarów dielektrycznych. Przykładowe widma strat dielektrycznych zarejestrowane w różnych warunkach termodynamicznych przedstawia rys. 5.32. W tym miejscu warto wspomnieć, iż niezależnie od warunków ciśnieniowych w jakich przeprowadzono pomiary dielektryczne krzywe absorpcji $\varepsilon''(f)$ GCM charakteryzuje znaczący wpływ przewodnictwa stałoprądowego. Dlatego też, aby ułatwić detekcję położenia maksimum procesu relaksacji strukturalnej wkład przewodnictwa został odjęty od całkowitego widma strat dielektrycznych. Otrzymany wynik przedstawia rys. 5.32. Jak łatwo zauważyć, wzrost ciśnienia powoduje ten sam efekt co obniżanie temperatury tj. przesuwanie się pików relaksacji strukturalnej w stronę niższych częstotliwości. Ponadto, proces α wykazuje całkiem silną zależność ciśnieniową. Mianowicie, ściskanie cieczy od $P = 0.1$ MPa do 190 MPa skutkuje zmianą położenia pików aż o 5 dekad częstotliwości.



Rys. 5.32 Widma strat dielektrycznych zarejestrowane w warunkach: a) izotermicznych $T = 383$ K ($p = 10 - 190$ MPa) oraz b) izobarycznych $P = 130$ MPa ($T = 373 - 398$ K).

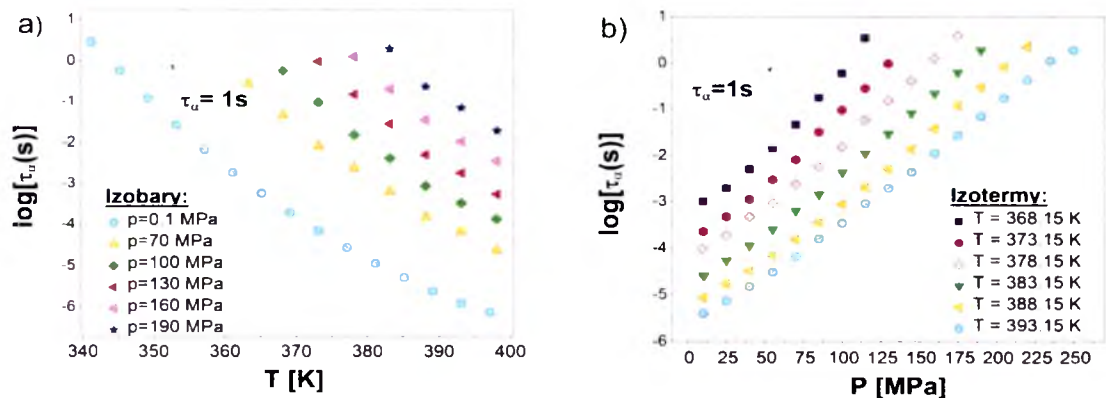
Analiza kształtu krzywych strat dielektrycznych zarejestrowanych w warunkach ciśnienia atmosferycznego, przedstawiona w paragrafie 5.2.1, pokazała że szerokość pików relaksacji α jest praktycznie niezależna od temperatury. Z tego punktu widzenia ciekawe wydaje się porównanie kształtu krzywych absorpcji $\varepsilon''(f)$ zarejestrowanych w trakcie pomiarów ciśnieniowych. W tym celu, wykorzystując dane zmierzone w różnych warunkach temperatury i ciśnienia, ale o zbliżonej częstotliwości maksimum procesu relaksacji strukturalnej (f_{\max}), skonstruowano wykres przedstawiony na rys. 5.33. Otrzymany wynik

prowadzi do wniosku, że kształt krzywej strat dielektrycznych i skrzydła nadmiarowego są identyczne dla tych samych czasów relaksacji α . Jest to tzw. superpozycja temperaturowo-ciśnieniowa. Wynik ten jest zgodny z danymi opublikowanymi w pracy [112], w której to autorzy pokazali, że zasada superpozycji w zmiennych warunkach T , P jest spełniona dla prawie 40 różnego typu materiałów. A zatem GCM jest kolejnym przykładem potwierdzającym tą regułę.



Rys. 5.33 Superpozycja krzywych strat dielektrycznych zarejestrowanych w różnych warunkach termodynamicznych, ale o zbliżonej częstotliwości maksimum piku relaksacji strukturalnej.

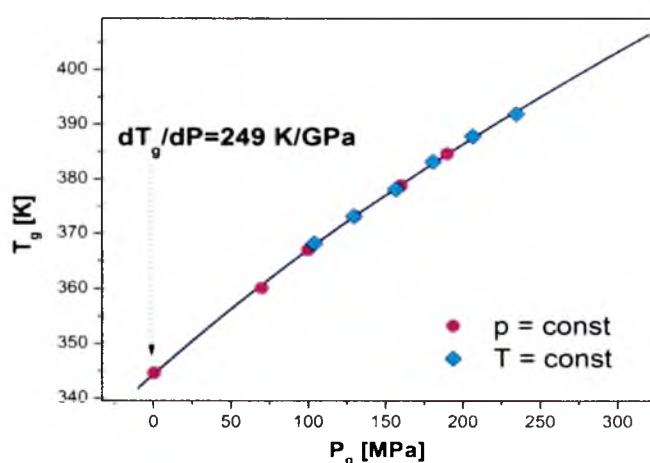
W następnym etapie analizy, przyjmując jako miarę czasu relaksacji odwrotność częstotliwości położenia maksimum piku strat dielektrycznych ϵ''_{\max} , wyznaczono ciśnieniowe i temperaturowe zależności τ_α . Otrzymane dane wykorzystano do skonstruowania dwóch map relaksacyjnych przedstawionych na rys. 5.34.



Rys. 5.34 Panel a przedstawia izobaryczne krzywe zależności czasów relaksacji od temperatury, podczas gdy panel b pokazuje izotermiczne zależności czasów relaksacji w funkcji ciśnienia. Linie ciągłe stanowią aproksymacje danych eksperymentalnych odpowiednio równaniem VFT (panel a) oraz pVFT (panel b).

Jak pokazują dane literaturowe, ciśnieniowe zależności czasów relaksacji tylko w nielicznych przypadkach można analizować w oparciu o prosty model aktywacyjny, posługując się w tym celu równaniem Arrheniusa o stałej wartości objętości aktywacji (równ. 1.3). O wiele częściej, podobnie jak w przypadku temperaturowych zależności $\log \tau_\alpha$ (rys. 5.34a), w miarę zbliżania się do punktu przejścia fazowego ciecz – szkło obserwuje się systematyczne odejście eksperymentalnie obserwowanych czasów relaksacji od arrheniusowskiego zachowania. Jak pokazuje rys. 5.34b nieliniowość zależność $\log \tau_\alpha(P)$ jest również obserwowana w przypadku badanego leku przeciwcukrzycowego. Dlatego też, do opisu punktów eksperymentalnych wykorzystano równanie będące ciśnieniowym odpowiednikiem funkcji VFT (równ. 1.5). Wynik aproksymacji danych dielektrycznych równaniem pVFT przedstawiony został również na rys. 5.34.

Dysponując pomiarami czasów relaksacji w szerokim zakresie ciśnień i temperatur dla GCM, możemy wyznaczyć linię $T_g(P)$ oraz określić wpływ ciśnienia na temperaturę zeszklenia badanego związku. Jak łatwo zauważyć na rys. 5.34, oszacowanie wartości temperatur oraz ciśnień odpowiadających formowaniu fazy szklistej zgodnie z klasycznymi definicjami, mówiącymi że ciecz przechłodzona staje się szkłem jeśli czas relaksacji przyjmuje wartość rzędu 100s, wymagałoby zastosowania znacznej ekstrapolacji danych funkcją VFT. Dlatego też, w tym przypadku wartości temperatury oraz ciśnienia przejścia szklistego wyznaczono dla $\tau_\alpha = 1s$. Otrzymany wynik, w postaci zależności $T_g(P_g)$ przedstawia rys. 5.35.



Rys. 5.35 Zależność temperatury zeszklenia T_g od ciśnienia. Linia ciągła stanowi aproksymację danych eksperymentalnych równaniem Andersson-Andersson.

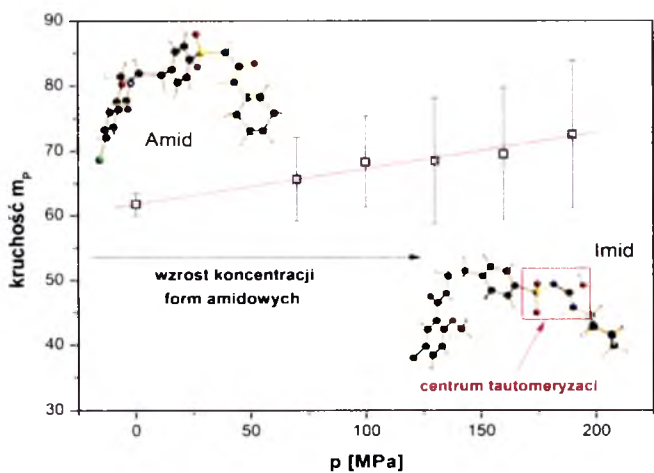
Powyższy rysunek wyraźnie pokazuje, że w badanym zakresie ciśnień temperatura przejścia do fazy szkła rośnie podczas ściskania próbki. Dodatkowo, łatwo zauważyć, że relacja $T_g(P_g)$

nie jest liniowa. Tego rodzaju zachowanie, powszechnie obserwowane w ciśnieniowych badaniach cieczy tworzących szkliska, można opisać wykorzystując równanie Andersson – Andersson:¹¹³

$$T_g = k_1 \left(1 + \frac{k_2}{k_3} P \right)^{1/k_2} \tag{5.13}$$

Najlepsze dopasowanie powyższej funkcji do danych eksperymentalnych uzyskano dla następującego zestawu parametrów: $k_1=344.36$ K, $k_2=3.86$ and $k_3=1382$ MPa. Warto nadmienić, iż stosunek k_1/k_3 umożliwia oszacowanie wartości dT_g/dP w ciśnieniu atmosferycznym, która dla GCM wynosi 249 K/GPa. Co ciekawe, otrzymany wynik jest zbliżony do tych charakteryzujących materiały van der waalsowskie (200–300 K/GPa) oraz o wiele większy niż wartości osiągane dla substancji tworzących wiązania wodorowe takie jak chociażby glicerol (40 K/GPa)¹¹⁴ czy sorbitol (43 K/GPa)¹¹⁵. Oznacza to, że GCM może być zaklasyfikowany jako typowy materiał van der waalsowski pomimo faktu, że może tworzyć słabe wiązania wodorowe.

W kolejnym etapie analizy wysokociśnieniowych danych dielektrycznych, posługując się równaniem 1.2 oszacowano odchylenie temperaturowych zależności czasów relaksacji strukturalnej, wyznaczonych dla różnych warunków izobarycznych, od przebiegu liniowego. Otrzymaną ciśnieniową zależność kruchości izobarycznej m_p , przedstawia rys. 5.36.



Rys. 5.36 Ciśnieniowa zależność kruchości izobarycznej GCM.

Przedstawione wyniki wyraźnie pokazują, że parametr kruchości lekko rośnie z ciśnieniem. Co ciekawe, tego typu zachowanie jest charakterystyczne jedynie dla substancji tworzących wiązania wodorowe, natomiast w przypadku cieczy van der waalsowskich, do

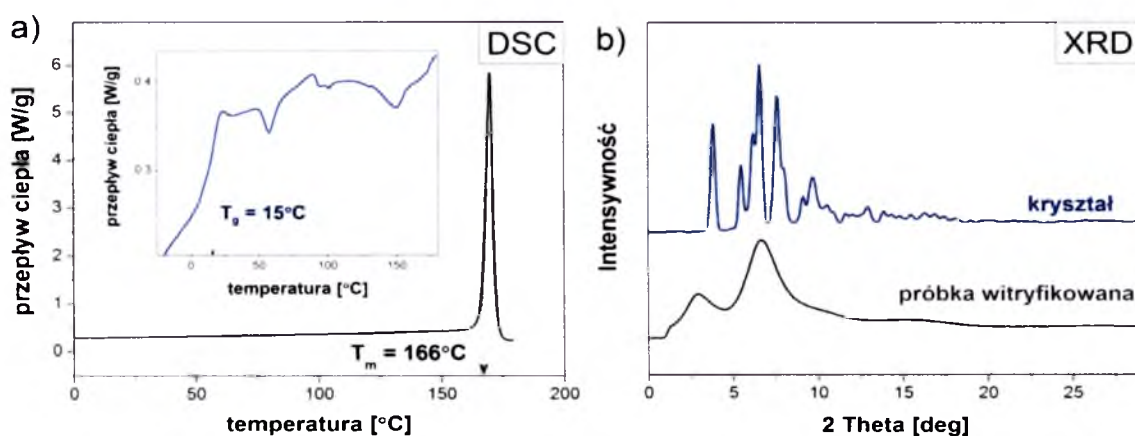
których zaklasyfikowano GCM, obserwujemy odwrotną tendencję, tj. kruchość malejącą z ciśnieniem. Nasuwa się więc pytanie, *jaki jest powód rosnącego trendu zależności $m_P(P)$* ? W tym kontekście warto przypomnieć, iż badany lek z uwagi na jego tendencje do izomeryzacji, jest bardzo nietypową substancją. Jak pokazano w paragrafie 5.2.1 substancja otrzymana zaraz po zeszkleniu różni się zarówno wartością T_g jak i m_P od tej, w której ustaliła się już równowaga między tautomeriami. Pomiar dielektryczny oraz badania spektroskopii FT-IR wykonane w ciśnieniu atmosferycznym jednoznacznie pokazały, że przyrost obydwu tych wielkości związany jest z malejącą ilością form imidowych. A zatem możemy przypuszczać, że wzrostowy trend zależności $m_P(P)$ również świadczy o spadku koncentracji imidowych izomerów GCM. Jeśli założenie to okazałoby się słuszne oznaczałoby to, że ciśnienie może być istotnym czynnikiem wpływającym na proces równowagowania w ciele stałym. Niestety, jak dotąd wpływ wysokiego ciśnienia na zjawisko tautomerizacji jest zupełnie nierozpoznanym problemem badawczym. Dlatego też, nie wiadomo czy proces ten jest jedynie aktywowany termicznie czy też istotną rolę odgrywa zmiana gęstości układu.

5.5 Badania amorficznej postaci gliklazydu (GCL)

Gliklazyd (GCL) jest jednym z nowocześniejszych leków przeciwcukrzycowych opartych na PSM, charakteryzujący się wysoką skutecznością, bezpieczeństwem stosowania oraz dobrą tolerancją pacjentów. Niestety, podobnie jak w przypadku pozostałych sulfonilomoczników, jego dostępność farmaceutyczna jest limitowana przez stosunkowo słabą rozpuszczalnością (190 $\mu\text{g/ml}$).¹¹⁶ W efekcie w celu uzyskania odpowiedniej skuteczności terapeutycznej konieczne są duże dawki leku, rzędu 80-120 mg/dobę. Dla porównania, glibenklamid, o którym była mowa w poprzednich podrozdziałach pracy, podaje się w dawce 5 mg. Dlatego też, z uwagi na stale rosnącą liczbę zachorowań na cukrzycę, duża część wysiłków badawczych skierowana jest na poszukiwanie metod pozwalających zwiększyć rozpuszczalność gliklazydu, a w konsekwencji zmniejszyć dawkę leku. Dotychczas cel ten próbowano osiągnąć głównie poprzez tworzenie kilkuskładnikowych układów zawierających oprócz trudno rozpuszczalnej substancji leczniczej, hydrofilowy, nietoksyczny nośnik pozbawiony działania farmakologicznego. Najczęściej jako nośnik wybierano β -cyklodekstrynę oraz polimery o różnej masie cząsteczkowej takie jak, glikol polietylenowy PEG (400, 6000 oraz 8000), hydroksypropylometyloceluloza (HPMC) oraz

poliwinylopirolidon (PVP)¹¹⁷. Jednak, jak dotąd, nie podejmowano prób amorfizacji gliklazydu. Dlatego też, tej tematyki będzie dotyczył niniejszy podrozdział.

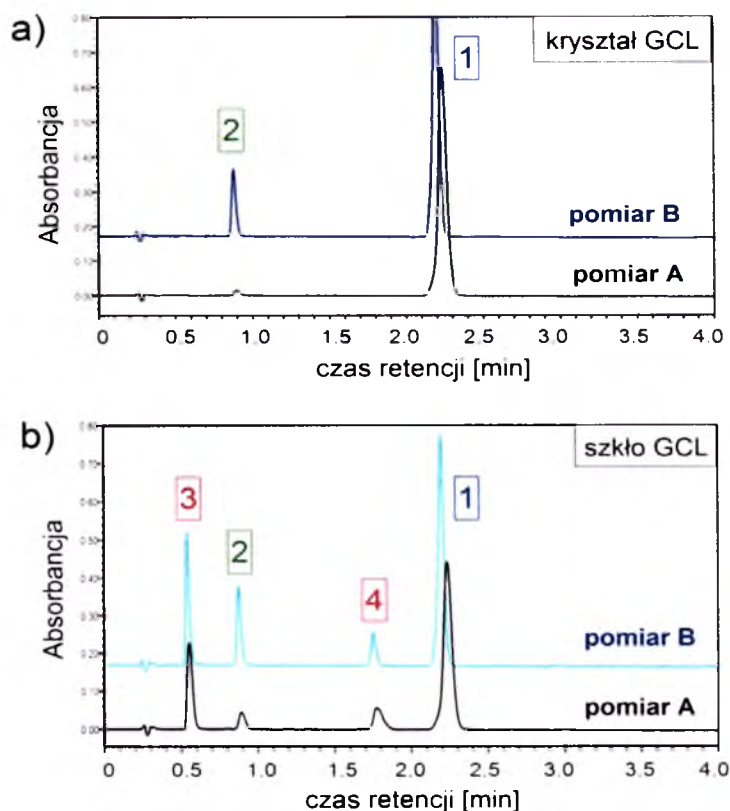
Z uwagi na to, iż najbardziej naturalnym sposobem przejścia do fazy szklistej jest szybkie ochłodzenie cieczy właśnie ta metoda amorfizacji została zastosowana jako pierwsza. Aby wyznaczyć temperaturę topnienia badanego materiału zastosowano technikę skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC). Termogram otrzymany podczas podgrzewania krystalicznej próbki GCL przedstawiony został na rys. 5.37a. Endotermiczny pik widoczny na poniższym rysunku w $T = 439 \text{ K}$ (166°C) wskazuje na temperaturę topnienia badanego materiału. Co ciekawe, otrzymana wartość różni się jedynie o 1 K od T_m poprzednio badanego glibenklamidu. Jak pokazuje rys. 5.37b szybkie przechłodzenie stopionego GCL do temperatury nieco przewyższającej 273 K okazało się skuteczną metodą otrzymania fazy szklistej badanego leku. Duża ilość refleksów Bragga zastąpiona szerokim „halo” amorficznym na dyfraktogramie rentgenowskim jednoznacznie potwierdza brak dalekozasięgowego uporządkowania charakterystycznego dla krystalicznej formy leku.



Rys. 5.37 Panel a: termogram DSC zarejestrowany podczas grzania krystalicznej próbki GCL (czarna linia) oraz formy witrifikowanej (wstawka). Panel b: dyfraktogram rentgenowski próbek krystalicznej (niebieska linia) oraz witrifikowanej (linia czarna).

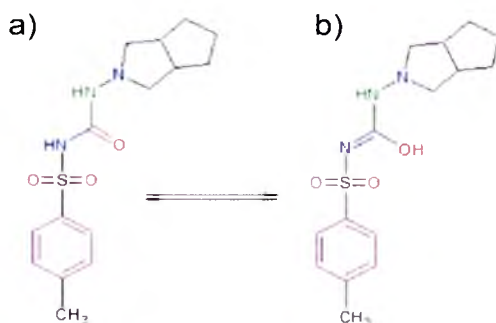
W kolejnym etapie badań, w celu wyznaczenia temperatury przejścia szklistego GCL, otrzymaną, amorficzną próbkę ogrzewano w aparacie DSC. Uzyskany wynik przedstawiony został w postaci wstawki do rys. 5.37a. Jak łatwo zauważyć, skok ciepła właściwego charakterystyczny dla przemiany szkło – ciecz pojawia się na termogramie w temperaturze 15°C (288 K). Jednak okazuje się, że nie jest to jedyny efekt cieplny towarzyszący ogrzewaniu próbki - w miarę wzrostu temperatury pojawia się szereg kolejnych, zarówno egzo- jak i endotermicznych. Taki wynik sugeruje degradację termiczną badanej substancji.

Dlatego też, w dalszej kolejności postanowiono zbadać czystości amorficznej formy GCL. Stosując technikę ultrasprawnej chromatografii cieczej (UPLC) wykonano pomiary czystości krystalicznej i witrifikowanej próbki leku.



Rys. 5.38 Chromatogramy próbek GCL krystalicznej (a) oraz witrifikowanej (b). Pomiar A w obydwu przypadkach wykonany został zaraz po rozpuszczeniu badanych materiałów w roztworze dichlorometanu. Z kolei pomiar B wykonano po 7 dniach od przygotowania próbek.

Jak łatwo zauważyć na rys. 5.38a chromatogram krystalicznej formy GCL składa się z dwóch pików, o czasach retencji odpowiednio 2.20 i 0.9 min, których intensywność wyraźnie zmienia się z czasem. W przypadku B, tj. gdy pomiar wykonano po tygodniu od rozpuszczenia badanych próbek, obserwujemy wyraźny wzrost intensywności piku oznaczonego jako 2, a jednocześnie spadek natężenia piku nr 1. Co ciekawe, obydwa piki charakteryzuje widmo UV gliklazydu. A zatem możemy przypuszczać, iż podobnie jak w przypadku glibenklamidu, pochodzą one odpowiednio od amidowego (nr 1) i imidowego (nr 2) izomeru badanej substancji (Rys. 5.39).



Rys. 5.39 Struktura chemiczna amidowej (a) oraz amidowej (b) formy gliklazydu.

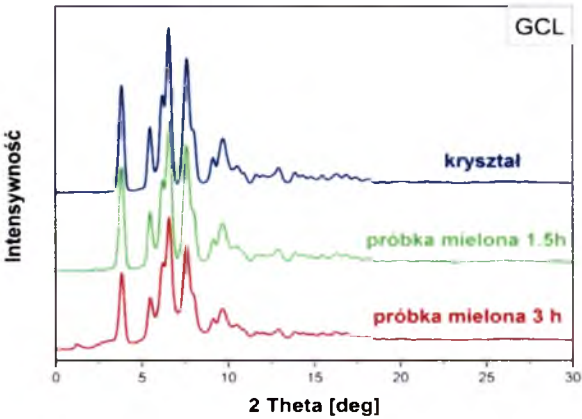
Taka interpretacja wyników bierze się z faktu, iż krystaliczną postać GCL stanowią amidowe izomery leku (Rys. 5.39a). A zatem zaraz po rozpuszczeniu próbki to jedynie one „widoczne” są w badanym materiale (jako pik nr 1). W tym miejscu warto również wspomnieć, iż w cząsteczce gliklazydu występuje tylko jedno centrum tautomerizacji, a mianowicie ugrupowanie sulfonilomocznikowe. Dlatego też, pojawienie się jednego dodatkowego pików na chromatogramie wydaje się być uzasadnione. Jednocześnie możemy wysunąć wniosek, iż rozpuszczalnik jakiemu użyto do przygotowania badanego roztworu tj. dichlorometan, jest substancją sprzyjającą reakcji izomeryzacji.

Mając na uwadze wyniki analiz UPLC otrzymanych dla krystalicznej próbki GCL, możemy oczekiwać, że na chromatogramie materiału amorficznego będą również dwa piki. Jednak okazuje się, że w tym przypadku ich ilość zdecydowanie wzrosła. Czarna linia na rys. 5.39b (pomiar A) będąca wynikiem pomiaru wykonanego zaraz po przygotowaniu roztworu GCL-CH₂Cl₂, pokazuje że oprócz form amidowych (pik nr 1) i imidowych (pik nr 2) amorficzna postać leku zawiera również dużą ilość zanieczyszczeń (piki 3 i 4). Na podstawie analizy powierzchni obserwowanych pików obliczono, że ich ilość wynosi w sumie ponad 26 % (Tabela 5.5). Jednocześnie form imidowych jest niecałe 5%. Ciekawych wyników dostarcza również pomiar wykonany po tygodniu od przygotowania próbki (linia B). Okazuje się bowiem, że niezależnie od tego, czy rozpuszczamy krystaliczną czy amorficzną postać leku po odpowiednim czasie osiągamy mniej więcej (z dokładnością do 1%) tą samą koncentrację form imidowych (14 %). Jednocześnie, możemy zauważyć, że ilość zanieczyszczeń badanego materiału praktycznie nie zmienia się z czasem. Podsumowując wyniki analiz przedstawione powyżej można powiedzieć, iż termiczna dekompozycja GCL, sugerowana w badaniach kalorymetrycznych, jest faktem.

Tabela 5.5 Ilościowa interpretacja chromatogramów UPLC badanych próbek GCL.

Nr piku retencji	Czas retencji [min]	Powierzchnia pików [%]			
		Kryształ GCL		Szkło GCL	
		Pomiar A	Pomiar B	Pomiar A	Pomiar B
3	0.56	-	-	20.2	21.2
2	0.90	1.5	13.7	4.6	14.4
4	1.78	-	-	6.8	8.8
1	2.24	98.5	86.3	66.2	57.5

Ponieważ ponad 26 % zawartość zanieczyszczeń witrifikowanej próbki GCL jednoznacznie dyskwalifikuje izobaryczne schładzanie cieczy jako metodę otrzymania amorficznej postaci badanego leku, w kolejnym etapie badań podjęto próbę amorfizacji gliklazyny przy pomocy techniki mielenia w atmosferze ciekłego azotu. W pierwszej kolejności przygotowano próbkę, której efektywny czas rozdrabniania wynosił 1.5 godziny (tj. 15, 6-minutowych cykli przedzielonych 3-minutowymi okresami chłodzącymi). Badania metodą dyfrakcji rentgenowskiej otrzymanego materiału nie potwierdziły jednak skuteczności zastosowanej procedury mielenia. Refleksy Bragga widoczne na rys. 5.40 jednoznacznie wskazują na krystaliczną strukturę badanej próbki, która charakteryzuje się jedynie zmniejszoną wielkością ziaren w porównaniu z wyjściową formą GCL. Dlatego też, zdecydowano o dwukrotnym wydłużeniu czasu mielenia. W tym miejscu warto nadmienić, iż właśnie taki czas był wystarczający do przygotowania amorficznej formy glibenklamidu. Dyfraktogram rentgenowski próbki GCL rozdrabnianej przez 3 godziny tj. przez 30 6-minutowych cykli, przedstawia czerwona linia na rys. 5.40. Jak się jednak okazuje, nawet tak długi czas mielenia próbki nie prowadzi do jej amorfizacji.



Rys. 5.40 Porównanie dyfraktogramów rentgenowski próbek GCL: krystalicznej oraz mielonych 1.5 oraz 3 godziny.

Dalsze wydłużanie czasu mielenia w celu otrzymania amorficznej, czystej próbki GCL nie wydaje się zasadne z uwagi na to, że nawet w przypadku, gdy zastosowana procedura okazałaby się skuteczna to byłaby ona bardzo czasochłonna, kosztowna, a w konsekwencji trudna do przeniesienia na skalę przemysłową.

Reasumując badania przedstawione w niniejszym podrozdziale możemy powiedzieć, że:

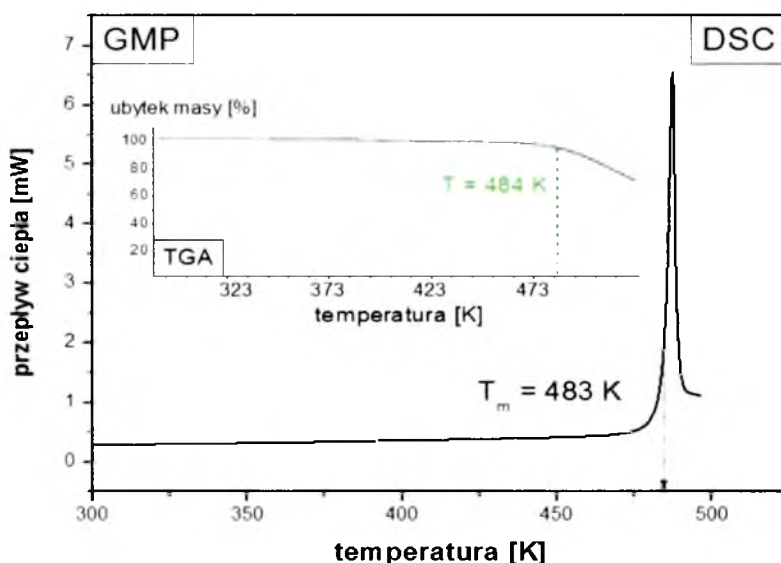
- w przypadku GCL, ani witrifikacja ani mielenie kriogeniczne nie są skutecznymi sposobami produkcji amorficznej postaci leku o zadowalającej czystości.
- metodzie witrifikacji GCL oprócz znacznego rozkładu termicznego towarzyszy zjawisko tautomeryzacji. A zatem próbka otrzymana w wyniku izobarycznego schładzania cieczy jest *de facto* mieszaniną czterech substancji.

6 BADANIA GLIMEPIRYDU (GMP) - LEKU PRZECIWCUKRZYCOWEGO III GENERACJI

Glimepiryd (GMP), będący pochodną sulfonilomocznika III generacji, jest jednym z najczęściej stosowanych leków hipoglikemizujących. Obecnie na światowym rynku farmaceutycznym dostępnych jest ponad 130 preparatów GMP, produkowanych w kilkudziesięciu krajach, w tym również w Polsce (Pliva Kraków, Biofarm, Polpharma czy Jelfa). Swoją „popularność” GMP zawdzięcza podwójnemu mechanizmowi działania. W odróżnieniu od pozostałych leków PSM, poza pobudzaniem komórek β do uwalniania insuliny wpływa on również na zwiększenie wrażliwości tkanek obwodowych na ten hormon oraz zmniejszenie jego wychwytu przez wątrobę. Jedyną wadą GMP jest jego bardzo mała rozpuszczalność wynosząca zaledwie $0.4 \mu\text{g/ml}$, najniższa wśród leków PSM. Ponieważ jednak glimepiryd bez żadnych przeszkód przenika przez bariery biologiczne, zwiększając jego rozpuszczalność możemy wpłynąć na ilość substancji leczniczej jaka dostanie się do krwiobiegu pacjenta. Dotychczasowe próby poprawy dostępności farmaceutycznej GMP obejmowały przede wszystkim tworzenie kompleksów z substancjami pomocniczymi o właściwościach hydrofilowych takimi jak PEG czy β -cyklodekstryna.^{118,119} Z uwagi na fakt, iż jak dotąd nie prowadzono badań dotyczących szklistej formy GMP w niniejszej pracy podjęto próby amorfizacji leku oraz wykonano pełną analizę jego fizyczno-chemicznych własności, łącznie z analizą rozpuszczalności w różnych warunkach pH.

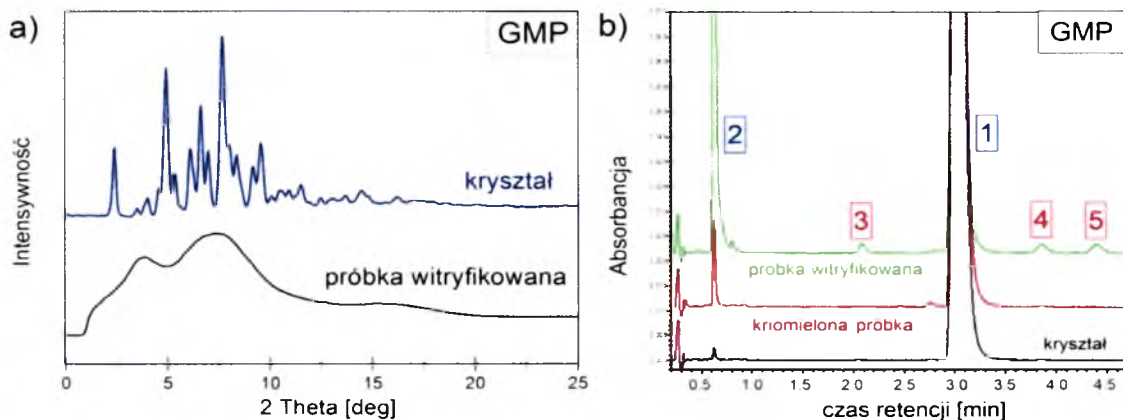
6.1 Chemiczna stabilność amorficznej postaci GMP

W celu otrzymania amorficznej próbki GMP, w pierwszej kolejności zastosowano technikę izobarycznego schładzania cieczy. Z uwagi na fakt, iż niezbędnym etapem procesu witrifikacji jest stopienie badanej substancji, przy pomocy skaningowej kalorymetrii różnicowej określono wartość temperatury topnienia glimepirydu. Endotermiczny pik widoczny w $T = 483 \text{ K}$ na rys. 6.1 wskazuje na T_m GMP. Z uwagi na fakt, iż wartość ta jest najwyższa spośród T_m wszystkich leków przeciwcukrzycowych z grupy PSM, możemy przypuszczać, iż istnieje niebezpieczeństwo dekompozycji termicznej badanej substancji. W celu zweryfikowania tego przypuszczenia wykonano badania termogravimetryczne. Ich wynik, przedstawiony we wstawce do rys.6.1 pokazuje, że zaledwie 1 K powyżej T_m następuje ubytek masy GMP. A zatem nie możemy wykluczyć, że witrifikowana próbka GMP może ulegać częściowej degradacji w T_m .



Rys. 6.1 Termogram DSC otrzymany podczas ogrzewania krystalicznej próbki GMP z tempem 10 K/min. Wstawka do rysunku przedstawia wynik badania termogravimetrycznego badanego leku.

Dlatego też, w kolejnym etapie wykonano badania czystości wityfikowanej próbki, której amorficzna struktura potwierdzona została techniką dyfrakcji rentgenowskiej (rys. 6.2a). Porównanie chromatogramów próbek krystalicznej i amorficznej przedstawia rys. 6.2b.



Rys. 6.2 (a) dyfraktogramy rentgenowskie próbek wityfikowanej i krystalicznej, (b) chromatogramy krystalicznej formy GMP oraz próbek amorficznych otrzymanych technikami wityfikacji oraz mielenia kriogenicznego.

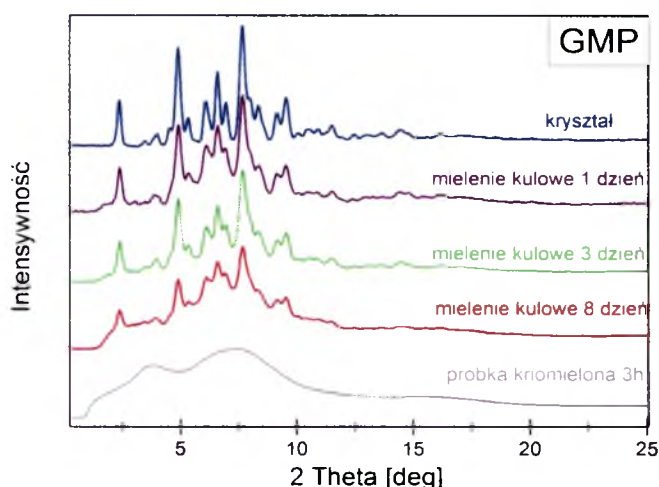
Jak łatwo zauważyć, chromatogram UPLC wityfikowanej formy leku zdecydowanie różni się od tego zarejestrowanego dla kryształu GMP. Z uwagi na fakt, iż składa się na niego aż pięć pików, a nie dwa jak dla próbki krystalicznej, można by przypuszczać, że GMP otrzymany

metodą izobarycznego schładzania cieczy jest zanieczyszczony. Co więcej, widma UV pików nr 3, 4 i 5 nie są tożsame z widmem glimepirydu. Dokładna analiza ilościowa chromatogramów przedstawiona w tabeli 6.1 wykazała jednak, iż ilość zanieczyszczeń wynosi zaledwie 1.25%.

Tabela 6.1 Ilościowa interpretacja chromatogramów UPLC badanych próbek CHL.

Nr piku retencji	Czas retencji [min]	Powierzchnia pików [%]		
		Kryształ GMP	Szkło GMP (kriomielenie)	Szkło GMP (witryfikacja)
2	0.60	0.12	1.19	20.18
3	2.10	-	-	0.37
1	3.10	99.83	98.81	78.57
4	3.70	-	-	0.43
5	4.40	-	-	0.45

Z kolei obecność pików o czasie retencji $t_R = 0.6$ min oraz znacznej intensywności świadczy najprawdopodobniej o tym, że witryfikowana forma GMP, podobnie jak omawiane wcześniej amorficzne próbki glibenklamidu i gliklazynu, jest mieszaniną izomerów konstytucyjnych różniących się między sobą czasem retencji. Z uwagi na to, że wszystkie leki oparte na PSM, charakteryzują się obecnością tego samego centrum tautomerizacji, obserwowane izomery GMP możemy nazwać, podobnie jak w przypadku GCL i GCM, amidem (pik nr 1) oraz imidem (pik nr 2). Aby upewnić się, że pik o czasie retencji $t_R = 0.6$ min na chromatogramie witryfikowanej próbki nie jest efektem jej rozkładu termicznego, podjęto próbę amorfizacji GMP metodami mielenia kulowego oraz kriogenicznego, w których to wpływ wysokiej temperatury na próbkę jest wyeliminowany. Jednak okazało się, iż pierwsza z wymienionych technik nie jest skuteczna. Jak pokazuje dyfraktogram przedstawiony na rys. 6.3 nawet kilkudniowe mielenie nie prowadzi do amorfizacji badanego materiału. Jedynym uzyskanym efektem jest nieznaczne zmniejszenie intensywności refleksów dyfrakcyjnych świadczące o redukcji wielkości ziaren GMP. O wiele bardziej efektywne okazało się być mielenie w temperaturze ciekłego azotu, kiedy to amorficzną próbkę glimepirydu uzyskano już po 3 godzinach efektywnego mielenia.

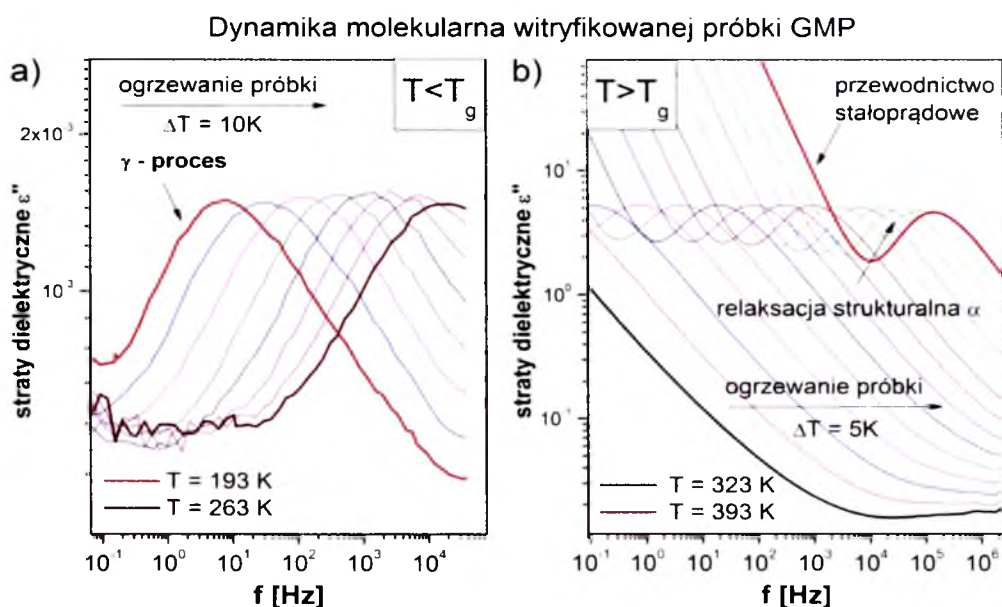


Rys. 6.3 Dyfraktogram rentgenowski próbek GMP poddanych mieleniu w temperaturze pokojowej oraz temperaturze ciekłego azotu.

Zgodnie z wcześniejszym założeniem materiał amorficzny otrzymany metodą mielenia w atmosferze azotu poddano badaniom UPLC. Co ciekawe, chromatogram tak przygotowanej próbki składa się jedynie z dwóch pików – nr 1 i 2. Przy czym intensywność sygnału o $t_R = 0.6$ min jest zdecydowanie mniejsza, niż obserwowana w przypadku próbki witryfikowanej. Otrzymane wyniki prowadzą do dwóch wniosków: 1) kriomielona próbka GMP charakteryzuje się 100% czystością, 2) materiał mielony w warunkach kriogenicznych podobnie jak próbka otrzymana przy pomocy techniki szybkiego schładzania stopu, jest mieszaniną tautomerów, jednak ilość form imidowych jest w tym przypadku zdecydowanie mniejsza. Wynosi zaledwie 1.19%. A zatem, GMP jest kolejnym przypadkiem substancji ulegającej transformacji typu amid – imid w warunkach kriogenicznych. Porównując powyższe wyniki z danymi eksperymentalnymi zgromadzonymi dla glibenklamidu, możemy oczekiwać kolejnej analogii. A mianowicie większej tendencji do rekrytalizacji w przypadku próbki otrzymanej drogą witryfikacji. Aby zweryfikować ten pogląd stosując techniki spektroskopii dielektrycznej oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej wykonano badania stabilności fizycznej obydwu amorficznych materiałów. Ich wyniki przedstawione zostały w kolejnym podrozdziale.

6.2 Dynamika molekularna fazy szklistej i cieczy przechłodzonej GMP

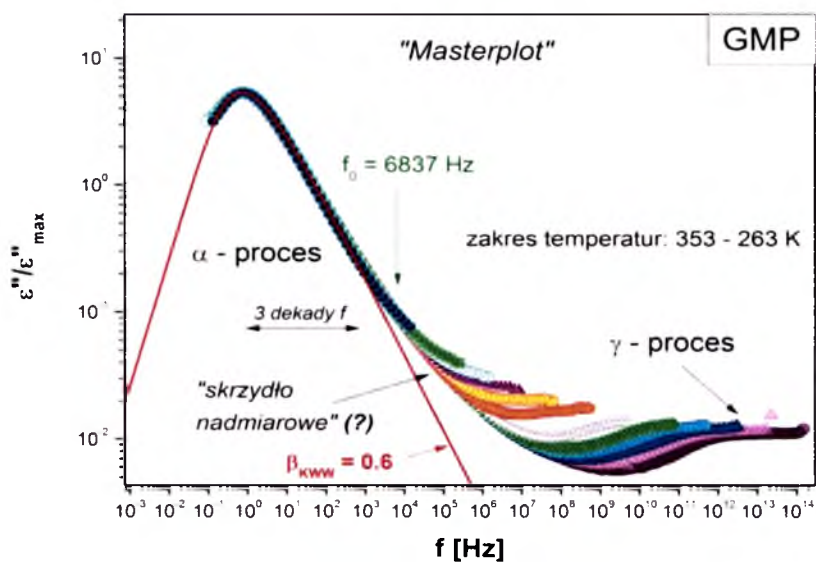
W celu prześledzenia dynamiki molekularnej glimepirydu w pierwszej kolejności przygotowano amorficzną próbkę leku. Jako metodę otrzymania fazy szklistej GMP wybrano gwałtowne ochłodzenie stopionej substancji. Tak przygotowany materiał poddano badaniom z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej. Ich wynik, w postaci krzywych absorpcji zarejestrowanych w szerokim zakresie temperatur 193 – 393 K, przedstawia rys. 6.4.



Rys. 6.4 Widma strat dielektrycznych zarejestrowane GMP zarejestrowane zarówno poniżej (a) jak i powyżej (b) temperatury zeszklenia.

Jak pokazuje rys. 6.4a, w temperaturze dużo niższej niż pokojowa, w oknie pomiarowym widoczny jest drugorzędowy proces relaksacyjny (γ), który podczas ogrzewania próbki przesuwa się w stronę wysokich częstotliwości, a w okolicy 273 K przestaje być widoczny. W zamian pojawia się proces α odzwierciedlający kooperatywny ruch molekuł GMP. Jak łatwo zauważyć na rys. 6.4b widma strat dielektrycznych GMP, podobnie jak krzywe $\epsilon''(f)$ chlorpropamidu i glibenklamidu, charakteryzuje wkład przewodnictwa stałoprądowego. Jednak w tym przypadku jest on na tyle mały, że nawet w obszarze przejścia ciecz – szkło nie utrudnia identyfikacji maksimum pików relaksacji strukturalnej. Z tego względu nie został on odjęty od całkowitego widma $\epsilon''(f)$.

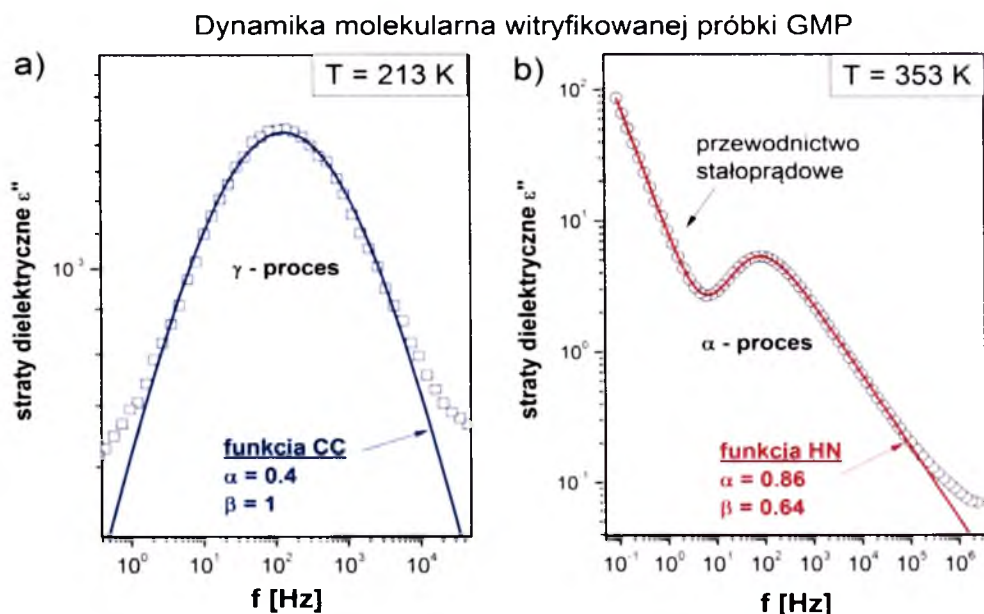
Aby sprawdzić, czy α i γ są jedynymi procesami relaksacyjnymi charakteryzującymi ciecz przechłodzoną i fazę szklistą badanego leku widma strat dielektrycznych zarejestrowane zarówno powyżej jak i poniżej temperatury zeszklenia zostały na siebie nałożone tworząc tzw. „masterplot” przedstawiony na rys. 6.5. Dzięki niemu możemy obserwować ewolucję dynamiki molekularnej zarówno szklistej jak i przechłodzonej formy GMP, na jednym rysunku.



Rys. 6.5 „Masterplot” złożony z widm strat dielektrycznych GMP zarejestrowanych w ciśnieniu atmosferycznym zarówno powyżej jak i poniżej T_g .

Analizę powyższych danych rozpoczęto od dokładnego określenia kształtu procesu relaksacji strukturalnej. Okazuje się, że pik α glimepirydu charakteryzuje się największą szerokością wśród procesów relaksacji strukturalnej zarejestrowanych dla wszystkich sulfonilomoczników badanych w niniejszej pracy. Parametr poszerzenia eksponencjalnego wynosi w tym przypadku $\beta_{KWW} = 0.60$. Ponadto, w odróżnieniu od CHL oraz GCM, funkcja KWW opisuje dane eksperymentalne nie tylko w obrębie maksimum pik, ale również 3 dekady powyżej f_{max} . Dlatego też, w tym przypadku, obecność „skrzydła nadmiarowego”, a w konsekwencji relaksacji II-rzędu ukrytej pod dominującym α - procesem, nie jest jednoznaczna. Nie jesteśmy w stanie rozstrzygnąć, czy GMP jest kolejnym przykładem materiału charakteryzującego się obecnością EW, czy też jako jedyny z badanej grupy związków nie posiada ukrytej relaksacji typu JG, a niewielkie odejście funkcji KWW od danych eksperymentalnych jest spowodowane wyłącznie wpływem relaksacji γ widocznej na rys. 6.5 w zakresie wysokich częstotliwości.

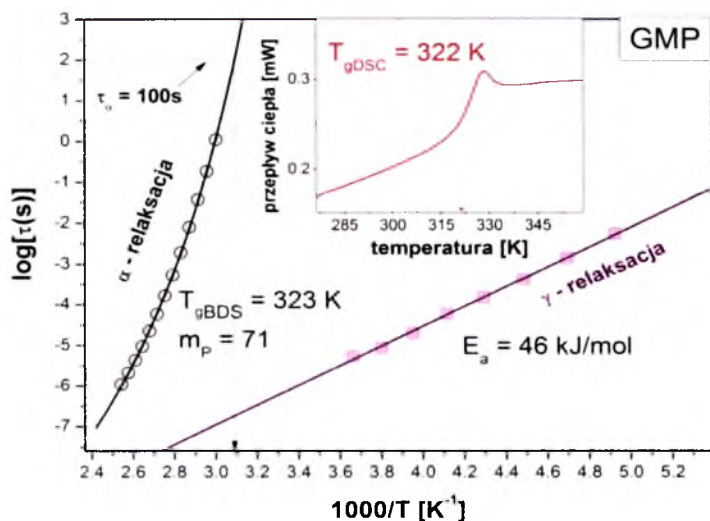
W kolejnym etapie badań dynamiki molekularnej GMP, wykorzystując parametry dopasowania funkcji HN i CC do danych zarejestrowanych w całym dostępnym eksperymentalnie zakresie temperatur (rys. 6.6), wyznaczono czas relaksacji τ będący odwrotnością częstotliwości położenia maksimum strat dielektrycznych f_{max} .



Rys. 6.6 Przykładowe aproksymacje krzywych strat dielektrycznych funkcjami HN i CC, zarejestrowanej zarówno poniżej (a) jak i powyżej temperatury zeszklenia GMP.

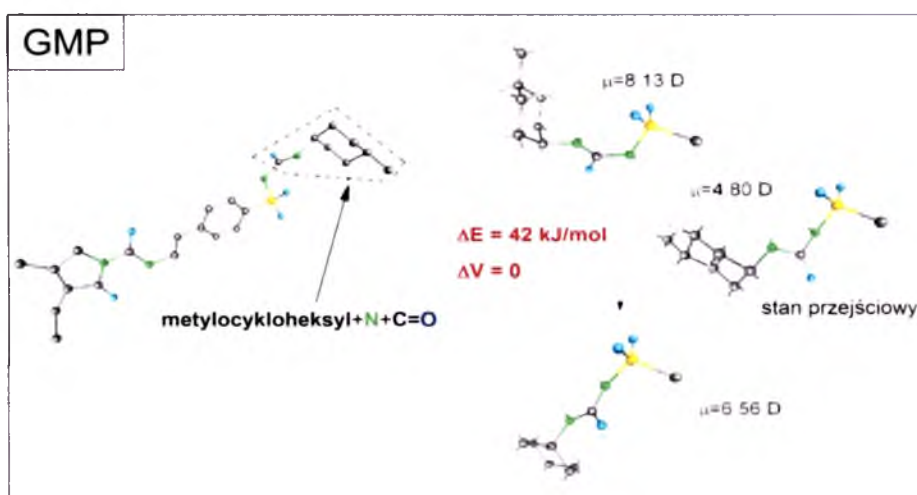
Wynikiem tak przeprowadzonych analiz jest kompletna mapa temperaturowych zależności czasów relaksacji, procesów dielektrycznych α i γ , przedstawiona na rys. 6.7. W celu wyznaczenia parametrów charakteryzujących witrifikowaną próbkę GMP, tj. jego temperaturę zeszklenia oraz kruchości izobaryczną, w pierwszej kolejności wykonano parametryzację niearrheniusowskiego zachowania krzywej $\tau_a(1/T)$ równaniem VFT, a następnie korzystając z ekstrapolacji powyższej funkcji do wartości $\log \tau_a = 2$ oszacowano T_g glimepirydu. Wynosi ona 323 K. Z uwagi na brak danych literaturowych charakteryzujących amorficzną formę badanego leku, w celu potwierdzenia oszacowanej wartości T_g wykonano badania kalorymetryczne. Termogram otrzymany podczas ogrzewania witrifikowanej postaci GMP przedstawia wstawka do rys. 6.7. Jak łatwo zauważyć otrzymano bardzo dobrą zgodność T_{gBDS} i T_{gDSC} . Co ciekawe, otrzymana wartość jest bardzo zbliżona do T_g próbki glibenklamidu przygotowanej w procesie gwałtownego chłodzenia cieczy (327 K), pomimo faktu, iż obydwa materiały znacząco różnią się temperaturami topnienia. W tym miejscu warto przypomnieć relację wiążącą wartości T_g oraz T_m . Otóż przyjmuje się, że temperatura zeszklenia substancji powinna wynosić w przybliżeniu $2/3$ jej T_m . Stosując tą zasadę do obydwu wspomnianych sylfonylomoczników otrzymujemy $T_{gGCM} = 293$ K oraz $T_{gGMP} = 325$ K. A zatem relacja T_g - T_m spełniona jest jedynie w przypadku próbki glimepirydu.

Pomimo zbliżonych wartości T_g glibenklamidu i glimepirydu różnią się nieco parametrem kruchości m_p . W przypadku GMP jest on większy o 7 jednostek.



Rys. 6.7 Temperaturowe zależności czasów relaksacji strukturalnej oraz II-rzędowego procesu γ . Czarna linia przedstawia funkcję VFT o parametrach $\log \tau_0 = -14.43 \pm 0.31$, $D_1 = 11.18 \pm 0.74$, $T_0 = 249 \pm 3 \text{ K}$, natomiast linia fioletowa jest wynikiem aproksymacji danych $\tau_\gamma(1/T)$ równaniem Arrheniusa.

Kontynuując analizę danych dielektrycznych GMP napotykamy na kolejne podobieństwa pomiędzy jego dynamiką molekularną, a ruchliwością cząsteczek glibenklamidu. A mianowicie energia aktywacji γ – relaksacji wyznaczona jako parametr dopasowania zależności $\tau_\gamma(1/T)$ równaniem Arrheniusa (równ. 5.1) wynosi dla GMP 46 kJ/mol i jest praktycznie równa $E_{a\gamma GCM}$. A zatem możemy przypuszczać, iż również molekularne pochodzenie tego II-rzędowego procesu relaksacyjnego jest tożsame dla obydwu substancji. Aby zweryfikować ten pogląd wykonano obliczenia kwantowo-mechaniczne obejmujące symulacje rotacji metylocykloheksanu wraz z atomem azotu i grupą karbonylową tj. fragmentu molekuly GMP bardzo zbliżonego do tego odpowiedzialnego za pochodzenie γ – procesu w przypadku cząsteczki GCM. Jak pokazuje rys. 6.8 oszacowana teoretycznie energia aktywacji odpowiadająca rotacji wspomnianego wcześniej fragmentu molekuly GMP zbliżona jest do eksperymentalnej $E_a \gamma$ - procesu. A zatem możemy powiedzieć, iż wewnątrzcząsteczkowy ruch pierścienia metylocykloheksanu wraz z ugrupowaniem $O=C-N$ jest źródłem relaksacji γ obserwowanym w niskich temperaturach na widmie strat dielektrycznych GMP.

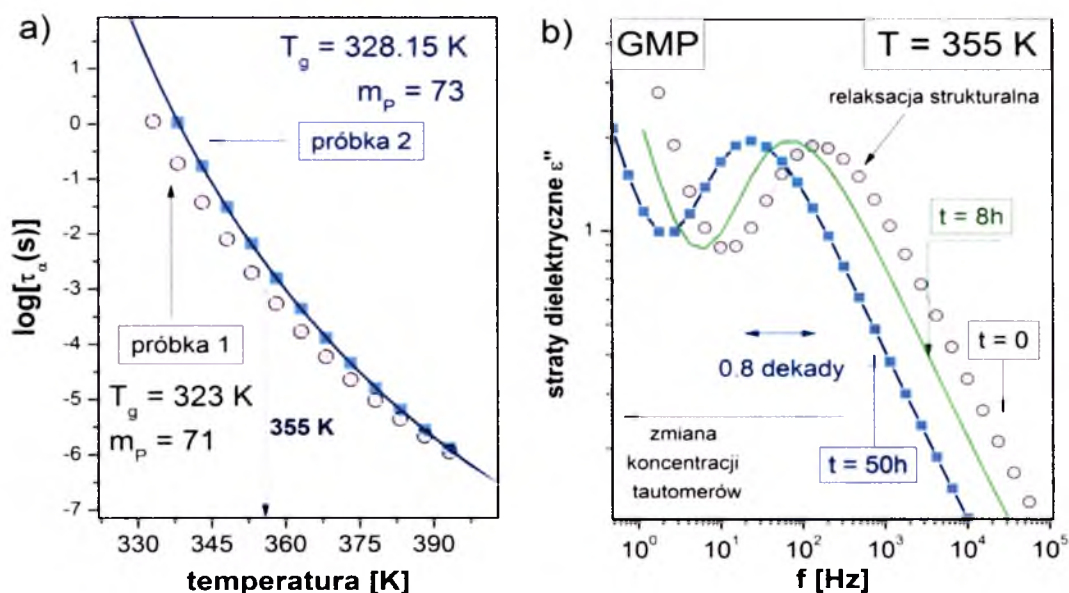


Rys. 6.8 Zmiany konformacyjne utożsamiane z relaksacją γ cząsteczki GMP, tj. obrót pierścienia metylocykloheksylowego wraz z sąsiadującym atomem azotu oraz grupą karbonylową.

6.3 Kinetyka reakcji transferu protonu w skondensowanej próbce GMP

Jak zostało pokazane w paragrafie 6.1 niniejszej pracy GMP jest kolejnym, obok glibenklamidu i gliklazydu, lekiem przeciwcukrzycowym, którego forma amorficzna jest mieszaniną kilku izomerów konstytucyjnych. Co ciekawe, porównując chromatogramy UPLC otrzymane dla wszystkich witrifikowanych próbek PSM, można zauważyć, że w przypadku GMP koncentracja form imidowych jest największa. A zatem możemy przypuszczać, iż w tym przypadku energia aktywacji reakcji transferu protonu jest niewielka, mniejsza niż bariera energetyczna konwersji imid-amid próbki glibenklamidu.¹⁰⁴ Metodą pozwalającą zweryfikować to założenie są badania kinetyki procesu tautomeryzacji GMP przy pomocy szerokopasmowej spektroskopii dielektrycznej. Jednakże warunkiem realizacji tego zadania jest różnica w wartościach temperatury zeszklenia bądź momentu dipolowego izomerów badanego leku. Dlatego też, w pierwszym etapie badań wykonano dodatkowy pomiar zespolonej przenikalności dielektrycznej witrifikowanej próbki GMP w szerokim zakresie temperatur. Jednak w odróżnieniu od danych przedstawionych w poprzednim paragrafie, w tym przypadku widma dielektryczne rejestrowane były podczas chłodzenia materiału. Zakładamy, że tego typu postępowanie będzie prowadziło do odmiennego przebiegu zależności $\log \tau_a(T)$, w sytuacji, gdy zmiana koncentracji izomerów pociąga za sobą różnicę w temperaturze przejścia szklanego badanego leku. Wynik procedury przedstawionej powyżej

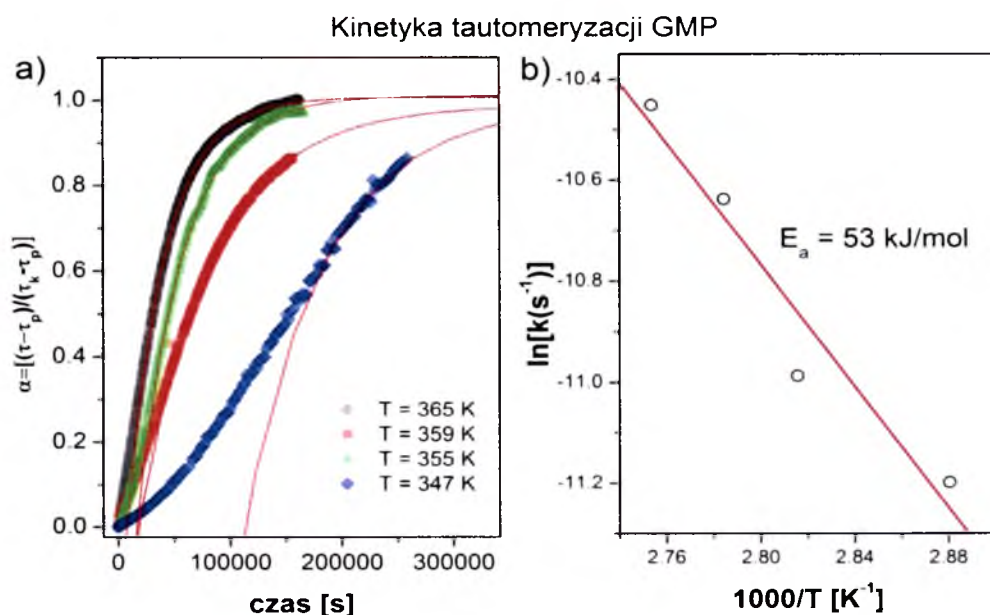
wyraźnie wskazuje na zmienność parametrów T_g oraz m_p w zależności od „historii termicznej” próbki GMP (rys. 6.9a). Z uwagi na fakt, iż omawiana substancja posiada te same centra tautomeryzacji co wszystkie leki PSM, poprzez analogię do glibenklamidu, możemy powiedzieć że próbka nr 2, o większych wartościach T_g oraz m_p , charakteryzuje się mniejszą koncentracją form imidowych niż materiał nr 1. A zatem, możemy oczekiwać, iż izotermiczny pomiar czasowy przeprowadzony w temperaturze przewyższającej T_g , będzie skutkował zwiększeniem lepkości próbki świadczącym o przebiegu reakcji transferu protonu w kierunku imid-amid. W celu potwierdzenia słuszności tego założenia witrifikowaną próbkę GMP wygrzewano w $T = 355$ K. Jak pokazuje rys. 6.9b, z czasem maksimum procesu relaksacji strukturalnej przesuwają się w stronę niskich częstotliwości, aż finalnie zatrzymuje się w odległości 0.8 dekady od położenia początkowego. Niezwykle istotne jest, że proces ten jest bardzo czasochłonny – we wspomnianych warunkach termicznych trwa aż 50 godzin.



Rys. 6.9 Panel (a) przedstawia temperaturowe zależności czasów relaksacji strukturalnej dwóch próbek GMP. Pierwszą zależność $\tau_\alpha(T)$ otrzymano w wyniku ogrzewania badanego materiału, z kolei drugą podczas chłodzenia próbki. Panel (b) przedstawia krzywe strat dielektrycznych GMP zarejestrowane podczas pomiaru czasowego w temperaturze $T = 355$ K.

W kolejnym etapie badań zjawiska tautomeryzacji witrifikowanej próbki GMP wykonano serię dielektrycznych pomiarów czasowych. Następnie, na podstawie zmian położenia piku relaksacji strukturalnej w czasie zarejestrowanych w czterech różnych temperaturach skonstruowano krzywe kinetyczne $\tau_\alpha(t)$. Aby móc przedstawić wszystkie otrzymane czasowe zależności τ_α na jednym rysunku konieczna jest ich normalizacja przy użyciu formuły 5.2.

Efekt tej procedury przedstawiony został na rys. 6.10a. Ponieważ krzywe kinetyczne opisujące reakcję transferu protonu w przechłodzonej fazie GMP mają przeważnie charakter eksponencjalny (za wyjątkiem krzywej zarejestrowanej w najniższej z mierzonych temperatur, która przypomina kształtem sigmoidę a nie eksponentę), można je opisać równaniem kinetycznym pierwszego rzędu (równ. 5.3). Z kolei, wykreślając zależność logarytmu stałej szybkości reakcji, będącej parametrem dopasowania równania 5.3 do danych eksperymentalnych, od odwrotności temperatury jesteśmy już o krok od oszacowania bariery energetycznej procesu tautomeryzacji GMP. Ponieważ zależność $\ln k = f(1/T)$ jest w przybliżeniu liniowa (rys. 6.10), energia aktywacji jest parametrem dopasowania równania Arrheniusa (równ. 5.5) do danych eksperymentalnych. Wynosi ona 53 kJ/mol. A zatem, zgodnie z założeniem poczynionym na początku niniejszego podrozdziału jest mniejsza niż bariera energetyczna transferu protonu w przechłodzonej próbce GCM.



Rys. 6.10 Panel (a) przedstawia znormalizowane krzywe kinetyczne zarejestrowane w czterech różnych pomiarach izotermicznych próbki GMP. Panel (b) to wykres zależności logarytmu stałej szybkości reakcji od odwrotności temperatury. Linia prosta jest wynikiem aproksymacji równania Arrheniusa do danych eksperymentalnych.

Jak łatwo zauważyć przedstawione powyższej wyniki badań zjawiska tautomeryzacji, a także dynamiki molekularnej GMP zawarte w poprzednim podrozdziale, wykazują wiele podobieństw z danymi zgromadzonymi dla leku II generacji, glibenklamidu. A zatem nasuwa

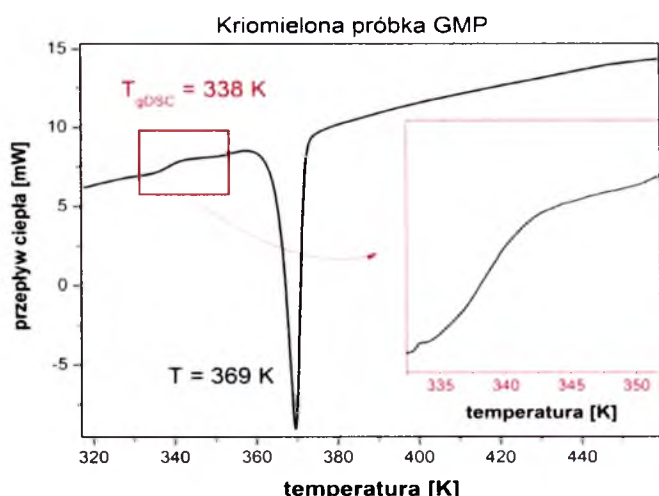
się pytanie, czy *stabilność fizyczna obydwu leków będzie również podobna*? Problemu tego dotyczy następny podrozdział.

6.4 Czynniki determinujące stabilność fizyczną amorficznej formy GMP

Rozpoczynając niniejszy paragraf warto nadmienić, że zjawisko rekrystalizacji amorficznych substancji leczniczych stanowi jeden z najbardziej atrakcyjnych obszarów badawczych. Jednak progres w tej dziedzinie jest bardzo powolny. Powodem jest ogromna ilość czynników wpływających na stabilność fazy szklistej. Należą do nich:

- parametry termodynamiczne układu,
- czynnik kinetyczny, tj. molekularna ruchliwość cząsteczek, zarówno globalna jak i lokalna,
- sposób przygotowania materiału amorficznego,
- oraz obecność dodatków znajdujących się w próbce.¹²⁰

W tym miejscu warto nadmienić, iż obecność izomerów konstytucyjnych danej substancji również znacząco wpływa na tendencje fazy amorficznej do rekrystalizacji. Biorąc pod uwagę powszechną opinię dotyczącą stabilności amorficznych układów binarnych możemy zakładać, że próbka o większej koncentracji domieszki, rozumianej jako mniej stabilne energetycznie izomery leku, będzie charakteryzowała się większą trwałością fizyczną. Przypuszczenie to zostało potwierdzone w rozdziale piątym, w którym pokazano, że stabilność amorficznej próbki glibenklamidu rośnie wraz z zawartością imidowych izomerów leku. Celem niniejszego podrozdziału jest sprawdzenie czy zasada ta dotyczy się tylko GCM, czy też obejmuje szerszą grupę sulfonilomoczników. Pogląd ten można łatwo zweryfikować porównując stabilność fizyczną próbek GMP uzyskanych przy pomocy techniki mielenia w warunkach kriogenicznych oraz metodą izobarycznego chłodzenia cieczy. Zgodnie z wynikami badań chromatograficznych kriomielony materiał, w odróżnieniu od próbki wityfikowanej, charakteryzuje się bardzo niewielką procentową zawartością form imidowych, wynoszącą zaledwie 1.25%. A zatem, możemy przypuszczać, że w porównaniu z wityfikowaną formą leku, będzie on posiadał wyższą wartość temperatury zeszklenia oraz większą tendencję do rekrystalizacji. W celu sprawdzenia tej sugestii wykonano badania kalorymetryczne kriomielonej próbki GMP. Termogram uzyskany podczas ogrzewania mielonego materiału przedstawia rys. 6.11.



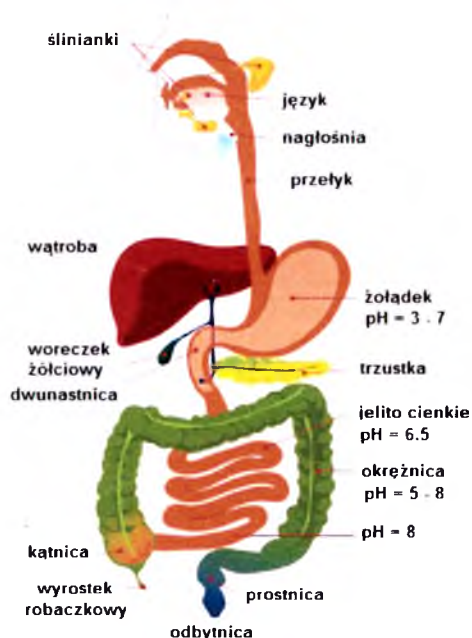
Rys. 6.11 Termogram DSC otrzymany podczas ogrzewania próbki GMP otrzymanej metodą mielenia w warunkach kriogenicznych.

Jak łatwo zauważyć na powyższym rysunku ogrzewaniu próbki towarzyszą dwa efekty energetyczne. Pierwszy z nich, związany z przejściem szkło – ciecz przechłodzona, widoczny w temperaturze 338 K, oraz drugi, egzotermiczny, obserwowany 30 K powyżej T_g świadczący o rekrytalizacji GMP. Porównanie powyższych danych z badaniami dynamiki molekularnej oraz kinetyki reakcji tautomeryzacji wityfikowanego GMP, które jednoznacznie wskazywały na stabilność fizyczną próbki podczas jej wygrzewania w temperaturach przewyższających T_g nawet przez kilkadziesiąt godzin, jednoznacznie potwierdza założenie o fizycznej stabilności amorficznych układów tautomeryzujących. Powyższe wnioski pokazują, iż obecność izomerów w amorficznej substancji leczniczej jest równie ważnym czynnikiem wpływającym na stabilność tych układów jak parametry kinetyczne czy termodynamiczne.

7 ANALIZA PORÓWNAWCZA ROZPUSZCZALNOŚCI AMORFICZNYCH FORM PSM

Do badań rozpuszczalności wytypowano dwa spośród czterech analizowanych w niniejszej pracy amorficznych leków przeciwcukrzycowych, glibenklamid oraz glimepiryd. Pozostałe PSM nie zostały uwzględnione w tych testach ponieważ, z uwagi na niestabilność

chemiczną bądź fizyczną, ich amorficzne formy nie mogą być produkowane na skalę przemysłową. W celu określenia rozpuszczalności GCM i GMP, w pierwszej kolejności amorficzne i krystaliczne próbki leków rozpuszczono w czterech mediach: kwasie solnym o stężeniu 0.1 mol/l, buforze octanowym, buforze fosforanowym oraz wodzie oczyszczonej. Następnie, ilość rozpuszczonych substancji oznaczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zastosowanie tego typu procedury umożliwiło analizę rozpuszczalności leków w szerokim zakresie pH, odzwierciedlającym warunki panujące w układzie pokarmowym człowieka (rys. 7.1).¹²¹ Badania rozpuszczalności GCM i GMP wykonano w Zakładach Farmaceutycznych „Polpharma S.A”,



Rys. 7.1 Układ pokarmowy człowieka.

a ich wyniki przedstawia tabela 7.1. Na podstawie poniższych danych łatwo zauważyć, iż amorficzne próbki GCM oraz GMP, niezależnie od metody otrzymywania, charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością, w porównaniu z ich odpowiednikami krystalicznymi. Pojawia się więc pytanie, *z czego wynikają zmiany rozpuszczalności rzeczywistej tych leków?* Otóż rozpuszczając metastabilną formę amorficzną osiągamy roztwór przesycony, który niestety ostatecznie powraca do stanu równowagi w wyniku wytrącania nadmiaru substancji. W rzeczywistości jednak roztwór przesycony często może istnieć wystarczająco długo, by spowodować wzrost parametrów dostępności farmaceutycznej, a w konsekwencji także biologicznej, słabo rozpuszczalnych substancji leczniczych.

Kontynuując analizę danych eksperymentalnych warto zwrócić uwagę na fakt, iż w obydwu badanych przypadkach, niezależnie od pH roztworu, substancja amorficzna

przygotowana techniką izobarycznego schładzania cieczy charakteryzuje się większą wartością rozpuszczalności, niż materiał otrzymany w wyniku mielenia kriogenicznego. Ponadto, pomimo faktu, że w przypadku amorficznej próbki GCM rozpuszczonej w wodzie zanotowano jedynie 4.5-krotny wzrost rozpuszczalności, podczas gdy witryfikowany GMP w tych samych warunkach rozpuszcza się 28 razy lepiej, rzeczywista wartość rozpuszczalności GCM jest większa niż GMP.

Tabela 7.1 Wyniki badań rozpuszczalności amorficznych form leków GCM i GMP.

Rodzaj rozpuszczalnika/pH	GCM*		GMP **	
	Rozpuszczalność [µg/ml]			
	Próbka mielona kriogenicznie	Próbka wityfikowana	Próbka mielona kriogenicznie	Próbka wityfikowana
0.1 M HCl	<0.05	<0.05	<0.2	<0.2
Bufor octanowy pH4.5	<0.05	<0.05	<0.2	0.42
Bufor fosforanowy pH 4.5	<0.05	<0.05	<0.2	0.30
Bufor fosforanowy pH 6.8	3.7	50.4	1.8	47.9
Bufor fosforanowy pH 7.5	8.2	103.3	4.2	72.6
Woda	12.1	17.9	0.7	11.4

*rozpuszczalność kryształu w wodzie 4 µg/ml, rozpuszczalność kryształu w buforze o pH = 7.5 wynosi 6 µg/ml; **rozpuszczalność kryształu w wodzie 0.4 µg/ml, rozpuszczalność kryształu w buforze o pH = 7.5 wynosi 3 µg/ml

Analizując zmianę rozpuszczalności obydwu próbek w zależności od pH łatwo zauważyć, iż rośnie ona wraz ze wzrostem zasadowości badanych roztworów. Podczas gdy, w środowisku kwaśnym jest ona poniżej detekcji aparatury, w pH = 7.5 obserwujemy niemal 17-krotny (GCM) i 24-krotny (GMP) wzrost rozpuszczalności próbek witryfikowanych w porównaniu z formą krystaliczną. Biorąc pod uwagę rys. 7.1 możemy wnioskować, że po podaniu doustnym, leki te będą wykazywały, podobnie jak ich odpowiedniki krystaliczne, największą rozpuszczalność dopiero w jelitach. Obserwacja ta jest bardzo ciekawa w kontekście badań biologicznych wykonanych na grupie leków PSM, ponieważ okazuje się, że substancje przeciwcukrzycowe oparte na sulfonilomoczniku wchłaniają się właśnie w jelitach.

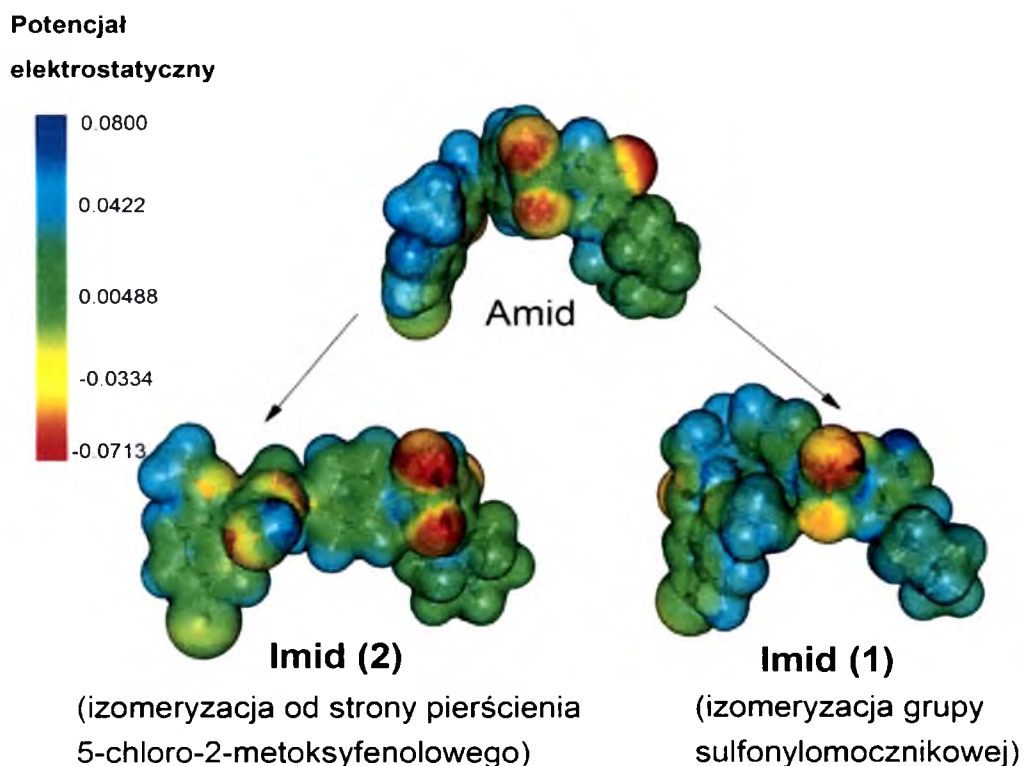
Kolejny aspekt jaki należy wziąć pod uwagę analizując rozpuszczalność GCM i GMP jest ich tendencja do izomeryzacji. Jak zostało przedstawione w poprzednich rozdziałach pracy amorficzne próbki wspomnianych substancji są *de facto* mieszaninami amidowych i imidowych izomerów konstytucyjnych, których koncentracja zależy od takich czynników jak, temperatura czy też pH. A zatem można oczekiwać, że zmianie równowagi kwasowo - zasadowej roztworu leku będzie towarzyszyć zmiana jego równowagi amidowo - imidowej. Pojawia się więc pytanie, *jakie izomery przeważają w alkalicznym środowisku?* Aby uzyskać odpowiedź na to pytanie przygotowano 3 roztwory różniące się kwasowością, pierwszy z nich o pH = 2, drugi o pH = 8, z kolei trzeci najbardziej alkaliczny o pH = 12, w których rozpuszczono krystaliczną formę GCM. Otrzymane próbki poddano następnie badaniom przy użyciu techniki magnetycznego rezonansu jądrowego. Na podstawie widm NMR, które nie zostały przedstawione w niniejszej pracy, można wnioskować, że w miarę wzrostu pH roztworu rośnie stężenie imidowych izomerów badanej substancji. Ich ilość stosunkowo niewielka w środowisku kwaśnym (3%), przy pH = 8 zaczyna dominować (68 %). Co więcej, okazuje się, że fragmentem molekuly najbardziej „narażonym” na transfer protonu jest jej mocznikowy region, a konkretnie wiązanie C-N od strony grupy sulfonylowej. Ponadto, w przypadku 24 % cząsteczek występuje dodatkowo tautomeryzacja ugrupowania związanego z pierścieniem metoksyfenolowym. Ciekawych wyników dostarczyła również analiza widma NMR zarejestrowanego dla najwyższej wartości pH. W tak alkalicznym środowisku dochodzi do hydrolizy próbki GCM, w wyniku której wspomniane wyżej wiązanie C-N zostaje zerwane. Na podstawie przedstawionych danych NMR możemy wnioskować, że wzrost rozpuszczalność amorficznych leków PSM może być spowodowany zwiększeniem koncentracji ich form imidowych w stosunku do wyjściowej próbki krystalicznej. Opierając się na tym stwierdzeniu możemy oczekiwać, że amorficzne próbki GCM i GMP, otrzymane metodą mielenia w warunkach kriogenicznych, wykazujące zdecydowanie mniejsze stężenie izomerów, niż formy wityfikowane, powinny charakteryzować się również mniejszymi wartościami rozpuszczalności. Dane przedstawione w tabeli 7.1 potwierdzają to przypuszczenie. Niezależnie od pH środowiska próbki kriomielone charakteryzuje mniejsza rozpuszczalność, niż materiały otrzymane drogą izobarycznego schładzania cieczy.

W kontekście przedstawionych wyników warto zadać pytanie o aktywność terapeutyczną imidowych izomerów PSM. A mianowicie, *czy imidowe i amidowe tautomery charakteryzuje taka sama zdolność hipoglikemizująca?* Zagadnienie to jest szczególnie istotne

z uwagi na fakt, iż niekiedy dwa tautomery jednej substancji leczniczej mogą charakteryzować się odmienną aktywnością. Przykładem może być erytromycyna, jeden z najczęściej przepisywanych antybiotyków makrolidowych. Zgodnie z danymi literaturowymi po rozpuszczeniu leku bądź jego amorfizacji oprócz wyjściowej formy ketonowej pojawiają się dwa izomery - cykliczne hemiketale. Ponadto wykazano, że jedynie keton wiąże się z rybosomami bakteryjnymi i hamuje syntezę ich białek, podczas gdy cykliczne hemiketale są zupełnie nieaktywne. Ponieważ pokazano, iż w przewodzie pokarmowym człowieka ilość nieaktywnych tautomerów sięga nawet 20%, aby osiągnąć optymalny efekt terapeutyczny erytromycyna musi być przyjmowana w dużej dawce (nawet 6 tabletek dziennie).

Aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące aktywności biologicznej imidowych izomerów leków PSM wykonano obliczenia kwantowo – mechaniczne mające na celu wizualizację potencjału elektrostatycznego na powierzchni amidowych i imidowych molekuł glibenklamidu. Zastosowanie tego typu procedury jest szczególnie istotne z punktu widzenia oddziaływań typu lek – receptor SUR, które mogą mieć charakter wiązań wodorowych, oddziaływań dipolowych, bądź van der Waalsowskich. Ponieważ w przypadku leków PSM działanie hipoglikemizujące przypisuje się ugrupowaniu sulfonilomocznikowemu cząsteczki, to właśnie ten fragment wydaje się być najważniejszy w trakcie dokowania leku do jego receptorów zlokalizowanych w komórkach trzustki. W konsekwencji zmiana potencjału elektrostatycznego tego właśnie fragmentu molekuly, wywołana wewnątrzcząsteczkową reakcją transferu protonu, może wpływać na skuteczność działania leku.

Jak pokazuje rys. 7.2, zarówno izomeryzacja grupy sulfonilomocznikowej jak i fragmentu związanego z pierścieniem metoksyfenolowym cząsteczki GCM pociąga za sobą zmianę wartości potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekuł. Jednocześnie warto zwrócić uwagę, iż w przypadku imidu oznaczonego numerem 2 zmiana potencjału wynika z rotacji pierścienia fenolowego niezbędnej do przeskoku protonu. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki możemy przypuszczać, iż imidowe tautomery leków PSM mogą charakteryzować się odmienną zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych, a w konsekwencji innym oddziaływaniem z receptorem SUR oraz aktywnością terapeutyczną.



Rys. 7.2 Wizualizacja rozkładu wartości potencjału elektrostatycznego na powierzchni amidowego i imidowych izomerów molekuly GCM.

Aby określić, które izomery odgrywają najważniejszą rolę w leczeniu cukrzycy warto prześledzić informacje dotyczące rozpuszczalności oraz dawek terapeutycznych krystalicznych leków PSM badanych w niniejszej pracy. Jedyne założenie, jakie poczyniono jest takie, iż tendencja do tautomeryzacji amorficznej formy leku PSM jest odzwierciedleniem zdolności do izomeryzacji rozpuszczonego kryształu. Uzasadnieniem takiego założenia mogą być chociażby badania gliklazydu, które pokazują, że niezależnie od tego czy rozpuszczany amorficzną czy krystaliczną próbkę w danych warunkach układ dąży do osiągnięcia tej samej równowagi między izomerami. Jak zostało pokazane w rozdziale trzecim, wszystkie badane substancje posiadają fragment sulfonilomocznikowy. A zatem, każda z nich powinna wykazywać, mniejsze bądź większe, tendencje do tworzenia imidowych izomerów. Na podstawie badań fizykochemicznych przedstawionych w niniejszej pracy, pokazano iż największa zdolność do izomeryzacji charakteryzuje glimepiryd, nieco mniejsza glibenklamid i gliklazyd, z kolei znikoma chlorpropamid. Jednocześnie warto zauważyć, iż dwie pierwsze wymienione substancje posiadają dwa centra tautomeryzacji. A zatem w zasadowym środowisku jelita cienkiego pojawia się znacząca ilość imidowych izomerów

GMP, GCM i GCL, podczas gdy CHL występuje głównie w formie amidu. Biorąc teraz pod uwagę fakt, iż lekiem podawanym w największej dawce jest chlorpropamid, z kolei substancją skuteczną w najmniejszych ilościach GMP, możemy wnioskować iż odpowiedzialność za aktywność terapeutyczną leków PSM spoczywa na imidowych izomerach powyższych leków. Oznacza to, że amidowe, najbardziej stabilne energetycznie tautomery, traktowane są jako produkty uboczne działania leku. W tym kontekście warto przypomnieć, że pośród całej grupy PSM to właśnie CHL, charakteryzujący się najmniejszą zdolnością izomeryzacji, a w konsekwencji największą koncentracją form amidowych, posiada najwięcej działań ubocznych. Jednocześnie GMP uważany jest za najbezpieczniejszy z sulfonilomocznikowych leków przeciwcukrzycowych. A zatem przygotowując amorficzne leki o zmiennej koncentracji tautomerów możemy nie tylko manipulować ich rozpuszczalnością, a w konsekwencji dostępnością farmaceutyczną, ale również wpływać na bezpieczeństwo ich stosowania.

8 PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki badań fizykochemicznych czterech amorficznych leków przeciwcukrzycowych należących do grupy pochodnych sulfonilomocznika tj. chlorpropamidu (CHL), glibenklamidu (GCM), gliklazydu (GCL) oraz glimepirydu (GMP). Pomimo faktu, iż każda z wymienionych substancji bardzo łatwo tworzy fazę szklaną, jedynie amorficzne próbki GCM i GMP charakteryzują się stabilnością fizyczną i chemiczną spełniającą rygorystyczne standardy przemysłu farmaceutycznego. Ponadto, produkty te, w porównaniu z ich krystalicznymi odpowiednikami dostępnymi obecnie na rynku, wyróżnia znacząca poprawa rozpuszczalności, a w konsekwencji większa dostępność farmaceutyczna. Dlatego też, produkcja tabletek GCM i GMP, w których substancja czynna występuje w postaci amorficznej, dałaby możliwość obniżenia dawki leku przy zachowanej aktywności terapeutycznej. Tego typu działania nie będą możliwe w przypadku pozostałych badanych leków PSM. Powodem tego jest znacząca tendencja do rekrytalizacji amorficznej próbki chlorpropamidu oraz dekompozycja termiczna gliklazydu. Istotne jest, iż GCL jest jedyną spośród analizowanych substancji ulegającą degradacji termicznej w procesie witrifikacji. Doniesienia literaturowe sugerujące dekompozycję glibenklamidu nie zostały potwierdzone. Wykorzystując techniki chromatograficzną (UPLC) oraz spektroskopową (FT-IR) wykazano, że próbka GCM ulega rozkładowi, ale dopiero po 30 minutach wygrzewania w temperaturze topnienia. Wtedy też, następuje zerwanie wiązania C-N sulfonilomocznikowego fragmentu molekuly.

W trakcie badań chemicznej stabilności amorficznych leków PSM zauważono także, iż większość z nich jest mieszaniną izomerów konstytucyjnych, amidu – obecnego w krystalicznej formie leku oraz imidu, powstałego na skutek indukowanej termicznie wewnątrzcząsteczkowej reakcji transferu protonu. Jedyną substancją ulegającą znikomej transformacji jest CHL. Co ciekawe, imidowe izomery leków wykryto, po raz pierwszy, również w przypadku próbek przygotowanych metodą mielenia w warunkach kriogenicznych. Jednak w tym przypadku ich ilość była zdecydowanie mniejsza, niż w materiałach otrzymanych w procesie izobarycznego schładzania cieczy. Na podstawie badań kalorymetrycznych oraz analiz ruchliwości molekularnej kriomielonych i witrifikowanych próbek GCM i GMP stwierdzono, że substancje różniące się koncentracją tautomerów posiadają również odmienne parametry charakteryzujące ich fazę szklaną tj. temperaturę

zeszklenia oraz kruchość dynamiczną, a także inną stabilność fizyczną. A mianowicie, wzrost stężenia imidowych izomerów PSM skutkuje obniżeniem wartości parametrów T_g i m_p oraz ograniczoną tendencją próbki do rekrytalizacji. Wniosek ten potwierdza ogólną regułę dotyczącą stabilności amorficznych układów binarnych.

Ponieważ tautomeryzacja fazy skondensowanej stanowi jak dotąd nieeksplorowany kierunek badań, w niniejszej pracy wykonano również analizę kinetyki reakcji transferu protonu w fazie amorficznej GCM i GMP, z wykorzystaniem techniki spektroskopii dielektrycznej. Tym sposobem pokazano, że oprócz badania dynamiki molekularnej substancji szklistych, BDS umożliwia również detekcję i monitoring kinetyki reakcji tautomeryzacji. Dzięki temu skomplikowane do tej pory badania procesu równoważenia w ciele stałym, polegające na określeniu skali czasowej zjawiska w różnych warunkach termodynamicznych oraz energii aktywacji reakcji tautomeryzacji, stały się możliwe. Obserwacje te spotkały się z wielkim zainteresowaniem środowiska naukowego. Wyniki opublikowane w *Journal of Chemical Physics* zostały uznane przez edytorów tego czasopisma jako jeden z najbardziej przyszłościowych kierunków badań (tzw. „research highlight”).

Na podstawie analizy rozpuszczalności oraz badań NMR wykonanych w szerokim zakresie pH, wywnioskowano również, że leki PSM zawdzięczają swoje działanie hipoglikemizujące imidowym izomerom molekuly, których ilość w środowisku alkalicznym, odpowiadającym pH soku jelitowego, zdecydowanie przewyższa koncentrację amidów. A zatem, tworząc amorficzne leki PSM charakteryzujące się obecnością izomerów o działaniu terapeutycznym, można zwiększyć ich biodostępność, a w konsekwencji zmniejszać ilość działań niepożądanych wynikających z ich stosowania. Najlepszym potwierdzeniem tego typu wniosków byłyby badania biologiczne polegające na podaniu amorficznej postaci leku PSM organizmom żywym. Jednak wykonanie tego typu analiz, z uwagi na to, iż jest bardzo kosztowne i długotrwałe, nie jest przedmiotem niniejszej pracy. Niemniej jednak jest to kolejny, niewyjaśniony dotąd, wątek w badaniach nad lekami PSM, który warto kontynuować w przyszłości.

Wyniki analiz chemicznej oraz fizycznej stabilności, a także efekty badań dynamiki molekularnej wszystkich czterech leków PSM zostały schematycznie przedstawione w tabeli 8.1.

Tabela 8.1 Własności fizykochemiczne amorficznych leków PSM.

Własności fizycznochemiczne	Chlorpropamid (CHL)	Glubenklamid (GCM)	Gliklazyd (GCL)	Glimepiryd (GMP)
Generacja	I	II		III
Metoda amorfizacji*	W/MK**	W/MK (3 h)	W***	W/MK (3h)
Chemiczna stabilność amorficznych PSM				
T _m [K]	400-402	440	439	483
Dekompozycja termiczna w T _m	Nie	Tak (po 30 min w T _m)	Tak (26 %)	Tak 2%
Tendencja do izomeryzacji/rodzaj	Nie	Tak		
		Tautomeryzacja amidowo - imidowa		
Zawartość form imidowych	-	16% (W), 5% (MK)	14% (W)	20% (W), 1.25% (MK)
Bariera energetyczna reakcji imid - amid	-	127/97 kJ/mol	-	53 kJ/mol
Dynamika molekularna amorficznych form PSM				
Temperatura zeszklenia T _g T _g = T(τ _α =100s)	283.5 (W)	327-338 (W), 342 (MK)	288 (W)	323-328 (W), 338 (MK)
Parametr kruchości m _p	64	64-78 (W), 82 (MK)	-	71-73 (W)
Parametr poszerzenia eksponencjalnego β _{KWW}	0.74	0.74	-	0.60
Obecność skrzydła nadmiarowego	Tak	Tak	-	Nie
Relaksacje II rzędowe	„near constant loss” ukryty β-proces, γ-proces znikomy	β-proces typu „pseudo-JG” (E _a =79 kJ/mol) γ-proces (E _a =49 kJ/mol)	-	γ-proces „non-JG” (E _a = 46 kJ/mol)
Stabilność fizyczna stanu amorficznego				
Stabilność formy W T<T _g	Nie	Tak (3 lata)	Tak (2 lata)	Tak (2 lata)
Stabilność formy W T>T _g	Nie (rekrytalizacja 320 K)***	Tak	-	Tak
Stabilność formy MK T<T _g	-	Tak (3 lata)	-	Nie
Stabilność formy MK T>T _g	-	Nie (rekrytalizacja 373 K)	-	Nie (rekrytalizacja T = 369 K)
Rozpuszczalność amorficznych form PSM				
Dawka leku w komercyjnej próbce [mg]	100-250	2.5-5	30-80	1-3
Rozpuszczalność formy krystalicznej w wodzie [μg/ml]	157	4	190	0.4
Rozpuszczalność formy W w wodzie [μg/ml]	-	17.9	-	11.4
Rozpuszczalność formy MK w wodzie [μg/ml]	-	12.1	-	0.7

*metoda amorfizacji mieleniem w warunkach kriogenicznych została oznaczona skrótem MK, podczas gdy witrifikację oznaczono literą W; **zgodnie z danymi literaturowymi amorficzną próbkę CHL można otrzymać metodą MK, jednak tego typu badania nie zostały wykonane w niniejszej pracy. ***nawet proces 3-godzinne mielenia nie prowadzi do amorfizacji GCL

LITERATURA

- ¹ K.I. Rother *The New England Journal of Medicine* 356, 15, 1499–501 (2007)
- ² <http://www.who.int/diabetes/en/>
- ³ E. Pomarnacka, *Prof. Zw. Dr hab. Zdzisław Brzozowski wybitny uczony z dziedziny chemii medycznej*, Wyd. Galan Gdańsk, (2009)
- ⁴ K. Grzybowska, M. Paluch, P. Włodarczyk, A. Grzybowski, K. Kaminski, and L. Hawelek, D. Zakowiecki, A. Kasprzycka, I. Jankowska-Sumara, *Mol. Pharmaceutics*, 9, 4, 894–904 (2012)
- ⁵ K. Adrjanowicz, K. Kaminski, M. Paluch, P. Włodarczyk, K. Grzybowska, Z. Wojnarowska, L. Hawelek, W. Sawicki, P. Lepek, R. Lunio *J. Pharm. Sci.* 99, 2, 828–839 (2010)
- ⁶ J. F. Willart and M. Descamps, *Mol. Pharmaceutics*, 5, 6, 905–920 (2008)
- ⁷ P. Martino, G. F. Palmieri, S. Martelli, *Chem. Pharm. Bull.* 48, 8, 1105–1108 (2008)
- ⁸ W. Zhou, R.K. Gilpin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 6, 1545–1556, (2004)
- ⁹ R. Zallen, *Fizyka ciał amorficznych*, PWN, Warszawa (1994)
- ¹⁰ W. Przygocki, A. Włochowicz, *Fizyka polimerów*, PWN, Warszawa (2001)
- ¹¹ Krzysztof Paluch, Lidia Tajber, *Farmacja Polska*, 65, 2, (2009)
- ¹² H.S. Chen and D. Turnbull, *Journal of Applied Physics* 40, 4214–4215 (1969)
- ¹³ H. Suga, *J. Mol. Liq.* 81, 25 (1999)
- ¹⁴ D. Craig, P. Royall, V. Kett, M. Hoptopn. *Int.J. Pharmaceutics.* (1999), 179: 179–207.
- ¹⁵ E. Yonemochi, S. Kitahara, S. Maeda, S. Yamamura, T. Oguchi, K. Yamamoto: *Europ. J. Pharm. Sci.* 7, 4, 331–338 (1999)
- ¹⁶ K. Kaminski, K. Adrjanowicz, Z. Wojnarowska, K. Grzybowska, L. Hawelek, M. Paluch, D. Zakowiecki, J. Mazgalski *J. Pharm. Sci.* DOI: 10.1002/jps.22479
- ¹⁷ http://www.ktf-split.hr/glossary/en_o.php?def=ball%20mill.
- ¹⁸ De Gusseme, C. Neves, J. F. Willart, A. Rameau, M. Descamps, *J Pharm Sci.* 2008, 97(11): 5000–12.
- ¹⁹ K. J. Crowley, G. Zografí. *J. Pharm. Sci.* 91: 492–507 (2002)
- ²⁰ K. Adrjanowicz, K. Kaminski, K. Grzybowska, L. Hawelek, M. Paluch, I. Gruszka, D. Zakowiecki, W. Sawicki, P. Lepek, W. Kamysz, L. Guzik L.
- ²¹ M. D. Ediger, C. A. Angell, S. R. Nagel, *J. Phys. Chem.* 100, 13200 (1996)

- ²² G. Floudas, M. Paluch, A. Grzybowski, K. Ngai, *Molecular Dynamics of Glass-Forming Systems: Effects of Pressure* (Series: Advances in Dielectrics, Series Editor: Friedrich Kremer), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011)
- ²³ W. Przygocki, A. Włochowicz, *Fizyka polimerów*, PWN, Warszawa (2001)
- ²⁴ C. A. Angell, *Science* 267, 1924 (1995)
- ²⁵ Z. Wojnarowska, C. M. Roland, A. Swiety-Pospiech, K. Grzybowska, and M. Paluch, *Phys. Rev. Lett.* 108, 015701 (2012)
- ²⁶ H. Vogel, *Phys. Z.* 22, 645–646 (1921)
- ²⁷ G. Fulcher, *J. Am. Ceram. Soc.* 1925, 8, 6, 339–355 (1925)
- ²⁸ G. Tammann, W. Hesse, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 156, 1, 245–257 (1926)
- ²⁹ C. A. Angell, *J. Non-Cryst. Solids*, 131-133, 13 (1991)
- ³⁰ C.A. Angell, *Science* 267, 1924 (1995)
- ³¹ Z. Wojnarowska, L. Hawelek, M. Paluch, W. Sawicki, K.L. Ngai - *J Chem Phys.* 28, 134, 4, 044517 (2011)
- ³² Z. Wojnarowska, K. Adrjanowicz, P. Włodarczyk, E. Kaminska, K. Kaminski, K. Grzybowska, R. Wrzalik, M. Paluch, K.L. Ngai, *J Phys Chem B* 113, 12536 (2009)
- ³³ K. Adrjanowicz, K. Kaminski, Z. Wojnarowska, M. Dulski, L. Hawelek, S. Pawlus and M. Paluch, *J. Phys. Chem. B*, 114, 19, 6579-6593 (2010)
- ³⁴ K. Adrjanowicz, Z. Wojnarowska, P. Włodarczyk, K. Kaminski, M. Paluch, J. Mazgalski *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 395 (2009)
- ³⁵ Z. Wojnarowska, K. Grzybowska, K. Adrjanowicz, K. Kaminski, M. Paluch, L. Hawelek, R. Wrzalik, M. Dulski, W. Sawicki, J. Mazgalski, A. Tukalska T. Bieg - *Mol. Pharmaceutics*, 7, 5, 1692–1707 (2010)
- ³⁶ M. Naoki and M. Matsushita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56, 2396, (1983)
- ³⁷ H. Forsman, P. Anderson, and G. Bäckström, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* 82, 857 (1986)
- ³⁸ M. Paluch, J. Ziolo, S. J. Rzoska, P. Habdas, *Phys. Rev. E* 54, 4008 (1996)
- ³⁹ Z. Wojnarowska, M. Paluch, A. Grzybowski, K. Adrjanowicz, K. Grzybowska, K. Kaminski, P. Włodarczyk, and J. Pionteck, *J. Chem. Phys* 131, 104505 (2009)
- ⁴⁰ G. P. Johari, M. Goldstein, *J. Chem. Phys.* 53, 2372 (1970)
- ⁴¹ G. P. Johari, M. Goldstein, *J. Chem. Phys.* 55, 4245 (1971)
- ⁴² K. L. Ngai, *J. Phys.: Condens. Matter* 15, S1107 (2003)

- ⁴³ K. L. Ngai, M. Paluch, J. Phys. Chem. B 107, 6865 (2003)
- ⁴⁴ K. L. Ngai, K. Y. Tsang, Phys. Rev. E 60, 4511 (1999)
- ⁴⁵ K. Nelson, American Chemical Society, Washington DC, Chap. 4, p. 45 (1997)
- ⁴⁶ G. Williams, D. C. Watts. Trans. Faraday, 66, 80 (1970)
- ⁴⁷ R. Kohlrausch, Ann. Phys. 91, 56, (1854)
- ⁴⁸ K. L. Ngai, M. Paluch, J. Chem. Phys. 120, 857 (2004)
- ⁴⁹ S. Hensel-Bielowka and M. Paluch Phys. Rev. Lett. 89, 025704 (2002)
- ⁵⁰ A. Oleś, Współczesne metody eksperymentalne fizyki fazy skondensowanej, <http://fatcat.ftj.agh.edu.pl/~zffs/dopobrania/wmeffs.pdf>
- ⁵¹ A. Oleś, Metody doświadczalne fizyki ciała stałego, WNT Warszawa (1998)
- ⁵² M. Ilcyszyn, Spektroskopia NMR, Wydaw. Uniwersytetu Wrocławskiego (1995)
- ⁵³ L.A. Kazicyna, N. B. Kupletskaya, *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych*, PWN, Warszawa (1976)
- ⁵⁴ W. Zieliński, A. Rajca, *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, WNT, Warszawa (2000)
- ⁵⁵ Z. Kęcki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN, Warszawa (1992)
- ⁵⁶ J. Sadlej, *Spektroskopia molekularna*, WNT, Warszawa (2002)
- ⁵⁷ M.H. Chiu, E. J. Prenner, J Pharm Bioallied Sci. 3, 1, 39–59 (2011)
- ⁵⁸ J.E.K. Schawe, T. Hütter, C. Heitz C. Thermochem. Acta. Tom 446, 147-155 (2006)
- ⁵⁹ J. Janik, Fizyka chemiczna, PWN, Warszawa (1989)
- ⁶⁰ F. Kremer, A. Schönhals, *Broadband dielectric spectroscopy*, Springer 2003
- ⁶¹ W. Hasse, S. Wróbel, *Relaxation Phenomena*, Springer, (2003)
- ⁶² A. Chełkowski, *Fizyka dielektryków*, Warszawa PWN, (1979)
- ⁶³ E. Donth, *The glass transition. Relaxation Dynamics in Liquids and Disordered Materials*, Springer (2001)
- ⁶⁴ S. Havriliak, S. Negami, Polym. Sci. C 16, 99 (1966)
- ⁶⁵ S. Havriliak, S. Negami, Polymer 8, 161 (1967)
- ⁶⁶ D. W. Davidson, R. H. Cole, J. Chem. Phys. 18, 1417 (1950)
- ⁶⁷ D. W. Davidson, R. H. Cole, J. Chem. Phys. 19, 1484 (1951)
- ⁶⁸ K. S. Cole, R. H. Cole, J. Chem. Phys. 9, 341 (1941)
- ⁶⁹ F. Alvarez, A. Alegria, J. Colmenero, Phys. Rev. B 44, 7306 (1991)
- ⁷⁰ http://www.novocontrol.de/html/turn_key_10_90.htm
- ⁷¹ G. Schaumburg, New broadband dielectric spectrometers, Dielectrics Newsletter (1994)

- ⁷² G. Schaumburg, *Dielectric Newsletters* 10, 1996
- ⁷³ Z. Witkiewicz, "Podstawy chromatografii", Wyd. WNT (2000)
- ⁷⁴ W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wyd. Nauk. PWN Warszawa (2002)
- ⁷⁵ M. Jasik, K. Dęmba, W. Karnafel, *Doustne leki przeciwcukrzycowe w terapii cukrzycy typu 2*, (2005) http://www.termedia.pl/Czasopismo/Przewodnik_Lekarza-8/Streszczenie-3243
- ⁷⁶ L. Majkowska, A. Stefański, *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 3, 1 (2003)
- ⁷⁷ G. L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah and J. R. Crison, *Pharm. Res.* 12: 413-420 (1995).
- ⁷⁸ J. Wąsicki, D.P. Kozlenko, S.E. Pankov, P. Bilski, A. Pajzderska, B.C. Hancock, A. Medek, W. Nawrocik, B.N. Savenko, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 4, 1426–1437 (2009)
- ⁷⁹ T.N. Drebuschak, A.A. Ogienko, E.V. Boldyreva, *Cryst. Eng. Comm.* 13, 4405-4410 (2011)
- ⁸⁰ V. A. Drebuschak, Tatiana N. Drebuschak, N. V. Chukanov and Elena V. Boldyreva, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93, 2 (2008)
- ⁸¹ M. Saifee, N. Inamdar, D.L. Dhamecha, A.A. Rathi *International Journal of Health Research*, 2, 4, 291-306 (2009)
- ⁸² A. P. Ayala, M. W. C. Caetano, S. B. Honorato, J. Mendes Filho, H. W. Siesler, S. N. Faudone, S. L. Cuffini, F. T. Martins, C. C. P. da Silva, J. Ellena, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43, 2, 263–272, (2012)
- ⁸³ K. L. Ngai, M. Paluch, *J. Phys. Chem. B*, 107, 6865-6872 (2003)
- ⁸⁴ S. Capaccioli, M. Paluch, D. Prevosto, Li-Min Wang, K. L. Ngai, *J. Phys. Chem. Lett*, 3, 735–743, (2012)
- ⁸⁵ G. Jarosz, M. Mierzwa, J. Ziolo, M. Paluch, H. Shirota, K.L. Ngai, *J Phys Chem B*. 10, 115, 44, 12709-16, (2011)
- ⁸⁶ K. Grzybowska, M. Paluch, A. Grzybowski, Z. Wojnarowska, L. Hawelek, K. Kolodziejczyk, K. Ngai, *J. Phys. Chem. B*, 114, 40, 12792–12801 (2010)
- ⁸⁷ S.L. Shamblyn, B.C. Hancock, Y. Dupuis, M.J. Pikal, *J. Pharm. Sci.* 89, 417–427, (1999)
- ⁸⁸ H. Tanaka, *J.Chem. Phys.* 111, 3163, 3175, (1999)
- ⁸⁹ Sang-Do Yeo, Min-Su Kim, Jong-Chan Lee, *The Journal of Supercritical Fluids*, 25, 2, 143–154, (2002)
- ⁹⁰ M. A. Hassan, N.M. Najib, M.S. Suleiman, *Int. J. Pharm.* 67, 131–137, (1991)

- ⁹¹ A. Panagopoulou-Kaplani, S. Malamataris, *Int. J. Pharm.* 195, 239, (2005)
- ⁹² J. E. Patterson, B.M.B. James, A.H. Forster, R.W. Lancaster, J.M. Butler, T. Rades, *J. Pharm. Sci.* 94, 9, 1999 (2005)
- ⁹³ T. Fukami, T. Furuishi, T. Suzuki, S. Hidaka, H. Ueda, K. Tomato, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 56, 61–64 (2006)
- ⁹⁴ G.G.G. Oliveira, H.G. Ferraz, J.S.R. Matos, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 79, 2, 267-270, (2005)
- ⁹⁵ J. F. Willart, M. Descamps 2008, 5(6): 905–920
- ⁹⁶ A.R. Sheth, J.W. Lubach, E.J. Munson, F.X. Muller, D.J.W. Grant, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (18), 6641-6651 (2005)
- ⁹⁷ G. P. Johari *J. Chem. Phys.* 58, 1766 (1973)
- ⁹⁸ P. K. Dixon, L. Wu, S. R. Nagel, B. D. Williams, J. P. Carini, *Phys. Rev. Lett* 65, 1108 (1990)
- ⁹⁹ T. Psurek, S. Hensel-Bielowka, M. Paluch, J. Ziolo *J. Chem. Phys.* 116, 9882 (2002)
- ¹⁰⁰ F. Stickel, E. W. Fischer, R. Richert, *J. Chem. Phys.* 102, 6251 (1995)
- ¹⁰¹ Z. Wojnarowska, K. Adrjanowicz, K. Kaminski, L. Hawelek, M. Paluch, *J. Phys. Chem. B* 25, 114, 46, 14815-20 (2010)
- ¹⁰² P. Włodarczyk, M. Paluch, Z. Wojnarowska, L. Hawelek, K. Kaminski, J. Pilch, *J. Phys.: Condens. Matter* 23 425901 (2011)
- ¹⁰³ J.R. Everett, E. Hunt, J.W. Tyler, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1481-1487, (1991)
- ¹⁰⁴ Z. Wojnarowska, P. Włodarczyk, K. Kaminski, K. Grzybowska, L. Hawelek, M. Paluch, *J. Chem. Phys.* 133, 8 (2010)
- ¹⁰⁵ P. Włodarczyk, K. Kaminski, M. Paluch, and J. Ziolo, *J. Phys. Chem. B* 113, 4379, (2009)
- ¹⁰⁶ P. Atkins and J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, 7th ed. Oxford University Press, New York, (2002)
- ¹⁰⁷ P. Włodarczyk, K. Kaminski, M. Dulski, S. Haracz, M. Paluch, and J. Ziolo, *J. Non-Cryst. Solids* 356, 738 (2010).
- ¹⁰⁸ S. Corezzi, E. Campani, P. A. Rolla, S. Capaccioli, and D. Fioretto, *J. Chem. Phys.* 111, 9343, (1999)
- ¹⁰⁹ S. Corezzi, E. Campani, P. A. Rolla, S. Capaccoli, D. Fioretto. *J. Chem. Phys.*, 107, 9343, (1999)
- ¹¹⁰ Z. Wojnarowska, M. Paluch, J. Pionteck, *J. Chem. Phys.* 135, 214506, (2011)

- ¹¹¹ C. M. Roland, S. Hensel-Bielówka, and M. Paluch, *Rep. Prog. Phys.* 68, 1405, (2005)
- ¹¹² K. L. Ngai, R. Casalini, S. Capaccioli, M. Paluch, and C. M. Roland, *J. Chem. Phys. B* 109, 17356, (2005)
- ¹¹³ S. P. Andersson and O. Andersson, *Macromolecules* 31, 2999, (1998)
- ¹¹⁴ O'Reilly, J. M. *J. Polym. Sci.*, 57, 429, (1962)
- ¹¹⁵ Atake, T.; Angell, C. A. *J. Phys. Chem.* 83, 3218, (1979)
- ¹¹⁶ E. Demrtürk, L. Oner, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 29, 21-25, (2004)
- ¹¹⁷ G.V. Shavi, A.R. Kumar, Y.N. Usha, K. Armugam, O. Ranjan, K. Ginjupalli, S. Pandey, N. Udupa, *International Journal of Drug Delivery* 2, 49-57 (2010)
- ¹¹⁸ H.O. Ammar, H.A. Salama, M. Ghorab, A.A. Mahmoud, *Int J Pharm.*, 17, 309, 129-38, (2006)
- ¹¹⁹ X. Ning, J. Sun, X. Han, Y. Wu, Z. Yan, J. Han, Z. He, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37, 6, 727–736 (2011)
- ¹²⁰ C. Bhugra, M.J. Pikal, *J Pharm Sci.* 97, 4, 1329-49 (2008)
- ¹²¹ <http://heartsworldwide.pl/artvku1.2307.uklad-pokarmowy.html>

